

N° d'ordre:.....

THÈSE

Présentée
Pour obtenir

**LE TITRE DE DOCTEUR DE L'INSTITUT NATIONAL POLYTECHNIQUE
DE TOULOUSE**

École doctorale: **SCIENCES DES PROCÉDES**

Spécialité: **GÉNIE DES PROCÉDES**

Par

Gamal AWAD

**CARACTERISATION ET ETUDE DE L'EFFET DES SOURCES
DE CARBONE ET D'AZOTE SUR LA PRODUCTION DE
NOUVEAUX METABOLITES SECONDAIRES CHEZ
ASPERGILLUS OCHRACEUS NON PRODUCTEUR DE
L'OCHRATOXINE A**

Soutenue le 07 janvier 2005, devant le jury composé de:

M. P. STREHAIANO (Pr. ENSIACET-INPT)

Président

M. A. LEBRIHI (Pr. ENSAT-INPT)

Directeur de thèse

M. M. BALTAS (D.R. CNRS - UPS Toulouse)

Rapporteur

M. J.L. PERNODET (D.R. U. ORSAY Paris XI)

Rapporteur

Mme. F. MATHIEU (Maître de Conférence, ENSAT-INPT)

Examinatrice

Tout d'abord, je remercie Dieu, le Généreux qui a enseigné à l'homme ce qu'il ne savait pas.

Je dédie affectueusement cette thèse,

A ma femme, qui pour me permettre d'accomplir ce travail, a accepté les sacrifices de mon éloignement de la famille, la responsabilité totale et la gestion de notre foyer et surtout d'assurer le devoir d'éducation de nos deux anges Amr et Reem, tout au long de ces dernières années, le temps de réalisation de cette thèse. Qu'elle reçoive à cette occasion l'expression de tout mon amour, de mes sentiments affectueux ainsi que ma reconnaissance pour sa patience durant toute cette période.

A mes deux enfants (Amr et Reem).

A mes frères et sœurs.

A ma famille.

A tous mes amis.

Avant-Propos

Ce travail a été réalisé au Laboratoire de Génie Chimique (UMR 5503, CNRS-INPT-UPS) dans l'équipe Génie des Systèmes Microbiens à l'École Nationale Supérieure Agronomique de Toulouse (ENSAT-INPT) sous la direction scientifique de Monsieur le Professeur Ahmed LEBRIHI. Je suis heureux de pouvoir lui exprimer toute ma profonde gratitude pour son accueil bienveillant et chaleureux, pour sa confiance qu'il m'a accordée dès mon arrivée dans son laboratoire et pour la formation scientifique que j'ai pu y acquérir. Je tiens ici à lui adresser tous mes remerciements pour ses bons conseils, pour l'intérêt qu'il a porté à mon travail et tout le temps qu'il m'a consacré.

Je ne saurais oublier Madame Florence MATHIEU, Maître de Conférences et Chercheur dans notre laboratoire pour sa gentillesse, ses encouragements et sa sympathie ainsi que ses très bons conseils lors de la rédaction de cette thèse.

Je souhaite exprimer également mes remerciements à Monsieur Michel BALTAS, Directeur de Recherche CNRS à l'université Paul Sabatier qui m'a fait le grand honneur de juger mon travail.

J'adresse mes remerciements à Messieurs les Professeurs Jean-Luc PERNODET et Pierre STREHAIANO qui m'ont fait l'honneur d'accepter de juger ce travail.

Enfin, je tiens à remercier les gens du laboratoire présents et de passage qui m' ont accompagné pour l'ambiance amicale qu' ils ont su créer durant ces dernières années et pour leur aide et leurs encouragements:

Noureddine et Ali et que je remercie pour leur aide précieuse et leur disponibilité, Abdelghani, Hadjira, Phong, Faouzi, Boubakeur, Hend et toute l' équipe GSM installé à Basso Cambo.

TABLES DES MATIERES

Chapitre III. Influence des sources de carbone et d'azote sur la production de deux composés herbicides (la melleine et le 4-hydroxymelleine) chez un mutant d'*Aspergillus ochraceus* et la souche sauvage

| | |
|---|---------|
| I. Introduction..... | 105 |
| II. Les Résultats..... | 107 |
| II.1. Isolement et purification de melleine et de 4-hydroxymelleine..... | 107 |
| II.2. La détermination des structures de melleine et de 4-hydroxymelleine..... | 108 |
| II.3. Etude comparative de production de la melleine et du 4-hydroxymelleine chez le mutant <i>A. ochraceus</i> M6 et la souche sauvage <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174..... | 109 |
| II.3.1. Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine chez le mutant <i>A. ochraceus</i> M6 et la souche sauvage NRRL 3174 | 109 |
| II.3.2. Effet des différentes concentrations de glucose et de dextrines sur la croissance et la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine | 115 |
| II.3.3. Cinétique de production de melleine et d'hydroxymelleine chez <i>A. ochraceus</i> M6 en présence de 50 g/l de dextrines et de glucose..... | 119 |
| II.3.4. Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine chez <i>A. ochraceus</i> M6 et <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174..... | 122 |
| III. Discussion..... | 128 |
| CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES..... | 132 |
| REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES..... | 138 |

ANNEXE : Publications sur le sujet

I. Article

Gamal Awad, Florence Mathieu, Yannick Coppel and Ahmed Lebrihi (October 29, 2004).
Characterization and regulation of new secondary metabolites from *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis. *Canadian Journal of Microbiology* (In press).

II. Communication

Gamal Awad, Florence Mathieu and Ahmed Lebrihi (2002). Biosynthesis of ochratoxin A and penicillic acid by *Aspergillus ochraceus*. International Union of Microbiological Societies. World Congresses. Du 27 juillet au 1er août 2002 à Paris (Communication affichée).

ABREVIATIONS

| | |
|-------------|--|
| ADN | : acide désoxyribonucléique |
| ARN | : acide ribonucléique |
| OTA | : ochratoxine A |
| MNNG | : <i>N</i> -Methyl, <i>N</i> -nitroso-guanidine |
| OSMAC | : One Strain- Many Compounds |
| A_w | : activité de l'eau |
| PKSs | : polykétides synthases |
| P-Pant | : phosphopantetheinyle |
| HMP | : hexoses monophosphate |
| CCM | : chromatographie sur couche mince |
| CLHP | : chromatographie liquide à haute performance |
| LC/MS | : chromatographie en phase liquide à la spectrométrie de masse |
| GC/MS | : chromatographie en phase gazeuse à la spectrométrie de masse |
| RMN | : résonance magnétique nucléaire |
| GDH | : glutamate déshydrogénase |
| GS | : glutamine synthétase |
| GOGAT | : glutamate synthase |
| ATP | : adénosine triphosphate |
| AP | : acide pénicillique |
| TR | : temps de rétention |
| CIM | : concentration Inhibitrice Minimale |
| PS_{max} | : le poids sec maximum |
| ADHP | : acide dihydropenicillique |
| μ_{max} | : le taux spécifique de croissance |
| PDA | : potato dextrose agar |
| ISP2 | : International <i>Streptomyces</i> Project 2 |
| CoA | : coenzyme-A |
| AFB1 | : aflatoxine B1 |
| TSTW | : trypton sel- Tween |

INTRODUCTION

Le terme de moisissure regroupe les champignons microscopiques qui intéressent l'économie et l'environnement humain (Diekman et Green, 1992; Diaz et Boermans, 1994). Certaines moisissures incluant les espèces d'*Acremonium*, d'*Alternaria*, d'*Aspergillus*, de *Chaetomium*, de *Cladosporium*, de *Fusarium*, de *Paecilomyces*, de *Penicillium*, de *Stachybotrys*, et de *Trichoderma* (Davis, 2001; Abbott, 2002) sont connues pour produire des mycotoxines. Les *Aspergilli*, tels que *Aspergillus niger*, *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sont des espèces qui produisent de l'ochratoxine A (OTA) de même que d'autres métabolites secondaires comme la melleine, l'orthosporine, la diaporthine et l'asperlactone, etc. (Larsen et al., 2001).

Certaines moisissures peuvent avoir des effets bénéfiques: transformation de matières premières alimentaires, production d'antibiotiques, d'enzymes ou d'agents de flaveur, etc. D'autres sont, par contre, nuisibles : altération des denrées alimentaires, responsables de mycoses et d'allergies et de la biosynthèse de mycotoxines (Jayant et Suresh, 1999). De plus, la consommation de ces mycotoxines a induit des effets immunosuppresseurs, mutagéniques et cancérogéniques ainsi que des effets négatifs sur plusieurs organes chez l'homme, dont le rein et le foie, etc. (Miller, 2001; Johanning, *et al.*, 2002).

Les moisissures posent aussi des problèmes économiques dans de nombreux secteurs (Placinta *et al.*, 1999; Cabanes *et al.*, 2002): avec une baisse du rendement et de la qualité du grain dans la filière céréalière, chez les producteurs de volailles et de bétails, où une mortalité accrue et une baisse de la reproduction ont été observées. Les industries alimentaires sont également confrontées à ce problème croissant: ces moisissures provoquent ainsi des modifications de l'aspect des aliments, une altération des qualités organoleptiques et chimiques des aliments, et la production de substances altérées non vendables. Les coûts de détoxification sont souvent onéreux et très limités dans le cas de contamination par des mycotoxines, étant donné leur pouvoir de résistance à différents stress (thermiques, chimiques, etc.) (Langseth *et al.*, 1993).

La production de plusieurs métabolites secondaires pourrait être résultée des perturbations enzymatiques, d'une condition différente de la culture, ou des mutagenèses par UV (Présagez et Zeeck, 2000).

L'exposition aux UV a été utilisée par plusieurs auteurs pour améliorer la production des métabolites secondaires dans les champignons et les bactéries. Par ailleurs, l'irradiation aux UV de matières brutes par "UV engenders", dans les industries agricoles, a produit des métabolites plus toxiques que ceux présents dans la souche sauvage, et/ou a induit la production de mycotoxine par des moisissures non toxinogéniques (Aziz et Smyk, 2002). Les

données obtenues dans cette étude suggèrent que les traitements mutagènes sont la source des changements génétiques qui mènent aux variations biochimiques dans les cultures (Agrawal *et al.*, 1999). La mutagenèse ou la biosynthèse combinatoire offrent des possibilités de modification des voies de biosynthèse aboutissant à la production de nouvelles molécules (Reynolds, 1998).

La production des mycotoxines par les champignons est une conséquence combinée de la propriété génétique de la souche et de son environnement (Blumenthal, 2004). La production des métabolites secondaires est contrôlée par plusieurs éléments nutritifs. En effet, dans une seule et même espèce, les différences de niveaux de production sont sensiblement observées (Vining, 1990). L'azote et le carbone sont les principaux éléments nutritifs présents dans la nature, leur interaction joue un rôle important dans le métabolisme secondaire des microorganismes (Da Silva *et al.*, 2001). Plusieurs voies de biosynthèse de métabolites secondaires sont affectés négativement par les sources de carbone et d'azote qui sont favorable à la croissance, par exemple, le glucose et les sels d'ammonium (Sanchez et Demain, 2002) alors que la dextrine, l'amidon, le nitrate et certains acides aminés sont des stimulateurs de la production de plusieurs métabolites secondaires.

OBJECTIF DU TRAVAIL

Dans le cadre de cette étude, trois parties ont été étudiées:

La première partie était: la purification et la caractérisation de quatre nouveaux métabolites secondaires (**1, 2, 3 et 4**) lesquels ont été isolés du milieu de culture du mutant *A. ochraceus* M18, mutant non producteur d'ochratoxine A. Ce mutant est un des 18 mutants obtenus à la suite de l'exposition d'*A. ochraceus* NRRL 3174 aux UV. Nous sommes intéressés à l'effet des sources de carbone et d'azote sur la production de ces quatre composés.

La deuxième partie de ce travail s'est orientée dans un premier temps sur l'étude de l'influence des sources de carbone et d'azote comme éléments nutritifs qui peuvent affecter et contrôler la production des dérivés d'acide pénicillique ainsi que sur la production d'asperlactone et d'isoasperlactone, qui ont été induits par la mutagenèse, dans les cultures sur milieu synthétique liquide de *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174. Les activités biologiques de l'asperlactone et de l'isoasperlactone ont également été testées.

Dans la troisième partie de cette étude, nous avons isolé un mutant *A. ochraceus* M6, fortement producteur de melleine et de 4-hydroxymelleine (deux composés herbicides). Nous avons optimisé les conditions de la fermentation pour augmenter la croissance de la souche mutante et la production de ces métabolites secondaires. Nous avons également comparé les productions de ces métabolites chez le mutant *A. ochraceus* M6 et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

REVUE BIBLIOGRAPHIQUE

I. Généralités sur les champignons

D'après les estimations, il y a environ 1,5 millions d'espèces fongiques ; le nombre de champignons dans le monde représente, après les insectes, et probablement les bactéries, des grands nombres de ressources utilisées. Parmi environ 72 000 espèces de champignons ont été décrites, approximativement 5 % des champignons du monde ont été étudiés (Hawksworth, 1991; Hammond, 1992; Rossman, 1994; Heywood, 1995). Smith et Waller (1992) et Canon (1997) ont fait remarquer qu'il pourrait y avoir 1 million de champignons non identifiés sur les plantes tropicales. Peu importe le nombre réel de champignons, l'important est qu'ils doivent être considérés comme une extraordinaire ressource inexploitée, disponible pour l'industrie pharmaceutique.

Les champignons sont d'une grande importance, pas seulement en ce qui concerne la santé et l'industrie mais aussi du point de vue économique, grâce à leurs propriétés métaboliques. Ainsi, la capacité à produire des acides organiques, tels que l'acide citrique et itaconique, quelques enzymes, pigments et antibiotiques par les champignons a été exploitée (Topal, 1984). De plus, ces organismes sont, par leur présence dans le sol et l'air, des contaminants importants de la nourriture et des produits agricoles. En fin, les champignons sont capables de produire des mycotoxines.

On rencontre les moisissures toxigènes dans beaucoup de produits agricoles contaminés (Clevsrton et Ljunggren, 1985; Aziz, 1987). L'utilisation du marqueur génétique (ADN) pour la détection d'*Aspergilli* toxinogéniques dans la nourriture, est considérée comme un outil précieux pour la détection rapide et facile de ces moisissures (Boysen *et al.*, 2000). *A. flavus*, *A. candidus*, *A. niger*, *A. luchuensis*, *A. ochraceus*, *A. nidulans*, *F. moniliforme*, *F. oxysporum*, *F. alternata*, *Alternaria* spp., *Curvularia* sp., *Chaetomium citrinum*, *Penicillium*, et *Rhizopus stolonifer* ont été rapportés comme les moisissures les plus communes isolées de plantes médicinales (Ayres *et al.*, 1980; Roy *et al.*, 1988; Aziz et Youssef, 1991; Samson *et al.*, 2002).

Le genre *Aspergillus* est habituellement défini comme des champignons saprophytes, asexué produisant de grandes conidies noires ou brunes avec des phialides elles-mêmes arrangées sur une tête globuleuse. Cela est illustré par les 132 espèces arrangées en 18 groupes par Raper et Fennell (1965), compte tenu du regroupement une fonction des caractéristiques morphologiques ou physiologiques. *Aspergillus ochraceus* est une espèce du genre *Aspergillus*. L'approche morphologique de la taxonomie a mené à l'existence de plusieurs synonymes pour le genre *Aspergillus*. Ils sont: *Alliospora* Pim; *Aspergillonsis* Spegazzini; *Cladaspergillus* Ritg; *Cladosparum* Yuill et Yuill; *Euaspergilus* Ludwig;

Gutturomyces Rivolta; Raperia Subramaniam and Grove; Sceptromyces Corda; Spermatoloncha Spegazzini; Sphaeromyces Montagne; Sterigmatocystis Cramer; et Stilbothamnium Hennings (Bennett, 1985).

Depuis quelques années, le développement des méthodes analytiques et moléculaires a permis aux scientifiques de réaliser une classification des microorganismes selon des caractéristiques biochimiques basées sur l'étude de trois grandes classes principales de molécules:

- Les métabolites primaires, composés nécessaires aux fonctions vitales de l'organisme;
- Les métabolites secondaires tels que les alcaloïdes ou les terpènes, qui n'ont pas de fonctions vitales;
- Les sémantides qui portent l'information génétique: acide désoxyribonucléique (ADN), acide ribonucléique (ARN) et protéines.

Actuellement, la combinaison des diverses caractéristiques, telles que les caractéristiques morphologiques (par exemple, forme et taille cellulaire), physiologiques, métaboliques, écologiques et moléculaires, permet la classification et l'identification correcte, non seulement des bactéries et des levures mais aussi des champignons.

II. *Aspergillus ochraceus*

II.1. Définition

Aspergillus ochraceus Wilhelm (Wilhelm, 1887) est un champignon omniprésent dans notre environnement. Les souches de cette espèce sont fréquemment isolées du sol des déserts, des prairies et des sols cultivés. Elles contaminent les produits de la plante, les grains du café vert, les céréales, les épices, les cacahuètes et le maïs (Kozakiewicz, 1989; Wilson *et al.*, 2002). *A. ochraceus* est considéré comme la principale espèce productrice de l'ochratoxine A, dans les climats les plus chauds, cependant peu d'informations sont disponibles concernant la biosynthèse de ce composé (WHO, 2002).

La section *Aspergillus Circumdati* inclut historiquement des espèces dont *A. ochraceus* avec des têtes de conidies bisériées de couleur jaune à ocre. Les espèces *Aspergillus* de la section *Circumdati* ont un rôle économique étant responsables du phénomène de pourriture. La variabilité génétique de l'espèce *A. ochraceus*, a été examinée en utilisant des méthodes génotypiques (Varga *et al.*, 2000). Les souches d'*Aspergillus ochraceus* rapportées paraissent former un groupe totalement homogène, avec un haut degré de similarité entre toutes les souches (Schmidt *et al.*, 2003).

Aspergillus ochraceus pourrait jouer à la fois des rôles positif et négatif sur le plan économique.

II.2. Intérêt négatif

Aspergillus ochraceus est producteur de l'ochratoxine A (OTA) ainsi que des dérivés méthyle- et éthylester de cette mycotoxine (Fig. 1). L'OTA est hépato - et néphrotoxique et tératogénique. Des recherches sont en cours pour étudier le rôle génotoxique direct de l'OTA (Pfohl-Leszkowicz *et al.*, 1993; Castegnaro *et al.*, 1998). La liaison amide de l'OTA est hydrolysée par des peptidases non spécifiques en phénylalanine et ochratoxine α (Pitout, 1969). Bien que l'ochratoxine α soit généralement considérée non toxique (Xiao *et al.*, 1996), il a été rapporté qu'elle induisait des actions négatives sur les chromosomes (Follmann *et al.*, 1995). En plus de la liaison peptidique, la liaison du noyau de l'OTA pourrait être hydrolysée par des estérases d'origine microbienne, donnant le même produit qu'avec un traitement alcalin (Madsen *et al.*, 1983). Après ouverture du noyau de l'OTA, sa toxicité contre le *Bacillus brevis* disparaît (Xiao *et al.*, 1996) et sa demi-vie dans le rat se raccourcit considérablement (Li *et al.*, 1997). Cependant, l'ouverture du noyau lactonique est réversible et la toxine peut être régénérée sous des conditions acides (Valenta et Richter, 1998). Traditionnellement, les mycotoxines (actives par voie orale) ont un effet négatif sur la santé humaine et donc également dans l'industrie alimentaire. Par exemple l'exposition à l'ochratoxine A contribue probablement à la fréquence croissante de cancer rénal dans les pays Européens, par exemple (Castegnaro *et al.*, 1998; Creppy *et al.*, 1998). *Le moyen classique pour l'homme de consommer l'OTA est l'alimentation.* Cependant, le développement de la biotechnologie a ouvert la possibilité d'utiliser des champignons pour produire des médicaments thérapeutiques. Cela veut dire que autres mycotoxines peuvent être présentes dans les médicaments, et se trouver dans le corps humain par une nouvelle voie: l'injection ou l'admission orale des médicaments. Certaines mycotoxines qui maintenant ne sont pas considérées comme importantes dans l'industrie alimentaire, tels que les malformines produites par *A. niger*, peuvent devenir pertinentes pour la santé humaine dans des médicaments (Blumenthal, 2004).

A. ochraceus est aussi considéré responsable de l'aspergillose du broncho-pulmonaire allergique (Novey et Puits, 1978). La melleine est un métabolite produit dans plusieurs micro-organismes, par exemple *A. ochraceus* ou *A. alutaceus* (Moore *et al.*, 1972). Bruinink *et al.* (1998) a montré des effets toxiques sur les plantes.

II.3. Intérêt positif

A. ochraceus est utilisé dans l'industrie pharmaceutique pour la bioconversion des stéroïdes et des alcaloïdes (Chen *et al.*, 1994; Regeat *et al.*, 1994) et pour la production d'enzymes (Chadha et Garcha, 1992). Les sclérotes de cette espèce sont la source de quelques composés avec des propriétés d'insecticides (De Guzman *et al.*, 1992, 1994, Chen *et al.*, 1994; Regeat *et al.*, 1994). Grâce au profil de restriction de l'ADN mitochondrial des techniques PCR et des séquences ITS, on distingue deux groupes d'isolats; aucun des isolats du groupe 2 ne produit de l'OTA, donc, ces isolats pourraient être utilisés dans les bioconversions des stéroïdes sans risque. Par ailleurs, les souches d'*Aspergillus* productrices de l'OTA se sont révélées être capables de métaboliser l'OTA avec le temps (Damoglou *et al.*, 1984). Dans le but de détruire l'OTA se trouvant dans des produits alimentaires, *A. ochraceus* pourrait servir comme source enzymatique.

III. Mutation

La modification et l'amélioration des souches microbiennes par mutation sont typiquement réalisées par exposition (*in vivo* ou *in vitro*) à une variété d'agents physiques ou chimiques appelés mutagènes. Les exemples de quelques mutagènes connus sont cités dans le tableau 1. La plupart de ces mutagènes causent quelques dommages à l'ADN par suppression, addition, transversion ou substitution de bases ou par rupture du double brins d'ADN (Parekh *et al.*, 2000). L'objectif des mutagenèses, pour améliorer des souches, est de maximiser la fréquence des mutations désirées. Le meilleur exemple est l'amélioration des souches de *Penicillium* pour la production de la pénicilline. Cette production est de 50 g/l, avec une amélioration d'au moins 4000 fois par rapport à la souche sauvage (Peberdy, 1985). D'autres exemples cités dans la littérature montrent que des souches fongiques ou d'actinomycètes sont aujourd'hui capables de produire des métabolites à des quantités aussi élevées que 80 g/l (Crueger et Crueger, 1984; Rowlands, 1984; Vinci et Byng, 1998). L'efficacité de la mutation aléatoire est dépendante de plusieurs autres facteurs: le type de culture utilisée (tels que les spores ou la conidie), les doses d'agents mutagènes et le temps d'exposition, le type et le dommage à l'ADN, les conditions du traitement et du post-traitement, la fréquence de traitement de l'agent mutagène, et l'ampleur de l'augmentation du rendement détectable (Vinci et Byng, 1998).

Les irradiations aux UV, les rayons gamma ou l'agent mutagène *N*-Methyl, *N*-nitroso-guanidine (MNNG) ont été utilisés pour améliorer le rendement de plusieurs métabolites secondaires produits par *A. niger* (Gupta et Sharma, 1995). Une suspension de spores d'*A. ochraceus* NRRL 3174 a été exposée aux UV ($\lambda = 254$ nm) à température ambiante montrant une chute de la viabilité et une rupture des brins d'ADN (Dose *et al.*, 1996).

Tableau 1. Quelques facteurs physico-chimiques et biologiques de mutation utilisés en biotechnologie microbienne (Parekh *et al.*, 2000)

| Mutagène | Mutation induite | Impact sur ADN | Effet Relatif du mutagène |
|--|---|--|---------------------------|
| La radiation | | | |
| L'ionisant radiation | | | |
| 1. Rayons X, rayons gamma | Seul ou double rupture d'ADN | Suppressions, changements structurels | Haut |
| Les courtes longueurs d'onde | | | |
| 2. Rayons UV | Dimerization des pyrimidines Cross link | Transversion, suppression, 'frame shift', transitions de GC→AT | moyen |
| Chimiques | | | |
| Les bas analogues | | | |
| 3. 5 - Chlorouracile 5 - Bromouracile | Résultats dans des assortissants défectueux | AT→GC, GC→AT transition. GC→AT transition. | Bas |
| 4. Agents déaminés d'aminopurine | Erreurs dans la reproduction ADN | | Bas |
| 5. Hydroxylamine (NH ₄ OH) | Déamination de cytosine | GC→AT transition | Bas |
| 6. acide Nitrous (HNO ₂) | Déamination d'A, C et G | Bi-directionnel translation, suppression AT→GC et/ou GC→AT | moyen |
| Agents d'Alkylation | | | |
| 7. N-Methyle-N'-nitro N-Nitrosoguanidine | Méthylation, haut Phényle | GC→AT transition | Haut |
| 8. Ethyle methanesulfonate | Alkylation de C et A | GC→AT transition | Haut |
| 9. Mustards di-(2-chloroethyle)-sulfide | Alkylation de bases C et A | GC→AT transition | Haut |
| Les agents intercalants | | | |
| 10. Bromide d'éthidium, 'acridine dyes' | Intercalation entre deux paires de la base | 'Frame shift', perte de la plasmides et 'microdélétions' | bas |
| Biologique | | | |
| 11. 'Phage, plasmid, DNA transposing' | Base substitution, rupture | Suppression, duplication, insertion | Haut |

IV. Métabolites secondaires

IV.1. Définition

Les métabolites secondaires sont des composés non essentiels au métabolisme basique des champignons. Ces composés sont généralement produits au cours de l'idiophase et peuvent être très diversifiés au niveau de leur structure chimique. Quelques métabolites sont spécifiques à une ou deux espèces alors que d'autres peuvent être produits par différents genres. Les métabolites secondaires ont pour origine à partir de précurseurs originaires du métabolisme primaire (acétyl-CoA, acides aminés...). Les enzymes responsables de la synthèse des métabolites secondaires sont très diversifiées suite à l'évolution de gènes impliquées, à l'origine, dans les fonctions métaboliques fondamentales (Steyn, 1980; Gaitatzis *et al.*, 2002).

Les champignons sont des producteurs prolifiques de métabolites secondaires. Turner (1971) a enregistré presque 1000 produits fongiques en 1971. En 1983, le chiffre avait plus que doublé (Turner et Aldridge, 1983). Non seulement les champignons peuvent montrer des productions impressionnantes mais leurs produits peuvent aussi avoir une grande importance commerciale. Les antibiotiques comme les pénicillines, les céphalosporines et la cyclosporine B (immunosuppressive) sont largement prescrites comme médicaments et sont classées dans les 5 % de vente des produits pharmaceutiques (Salle et Hawksworth, 1992; Whalley, 1994).

Les mycotoxines, métabolites secondaires, sont des dérivés de précurseurs issus du métabolisme primaire, tels que l'acétyl-CoA, les acides aminés, les phénols ou les composés terpéniques (Diagnostic Microbien, 2002). Les mycotoxines sont un moyen de défense pour les champignons contre les parasites ou contre d'autres organismes en concurrence dans le même environnement (Adams, 2002). Les mycotoxines ne sont généralement pas volatils (Nielsen, 2002; Mold-Heupel, 2001).

Des conditions environnementales spécifiques peuvent affecter la production des mycotoxines, telles que la composition du milieu de la culture, l'activité de l'eau, la valeur du pH, la température, la teneur en oxygène, et la présence d'organismes compétitifs (Davis, 2001; Johanning, *et al.*, 2002). Plusieurs recherches sont menées dans ce domaine pour mieux comprendre le rapport entre la contamination fongique et la production des mycotoxines (Graniti, 1991).

IV. 2. Les classes des métabolites secondaires

À première vue, les structures des métabolites secondaires peuvent paraître diverses. Cependant, la majorité de ces composés appartient à une même famille, et ont des caractéristiques structurales particulières issues de leur voie de biosynthèse. Les classes des métabolites secondaires sont:

- Les polykétides et les acides gras
- Les terpenoïdes et les stéroïdes
- Les propanoïdes phényles
- Les alcaloïdes
- Les acides aminés spécialisés et les peptides
- Les hydrates de carbone spécialisés

IV.3. Métabolites secondaires chez *Aspergillus* et *Penicillium*

Aspergillus et *Penicillium*, sont des champignons du sol ou de débris de plantes, qui disséminent leurs spores sur la plante ou dans les grains puis prolifèrent pendant le stockage si les conditions le leur permettent. *Aspergillus* et *Penicillium* ont une grande importance économique, écologique et médicale. En effet, les espèces de ces genres peuvent causer la dégradation de produits entreposés. De plus, ils sont utilisés dans l'industrie et la fermentation alimentaire, et ils existent dans différents types de sols, d'air ambiant, d'aliments et d'eau (Domsch *et al.*, 1980; Klich, 1993; Asan, 2000; Fischer et Dott, 2003; Eltem, 2004).

La production des métabolites secondaires extracellulaires et intracellulaires par plusieurs espèces d'*Aspergillus* a été directement détectée en utilisant la technique du "plug agar". *A. aculeatus*, *A. ochraceus* et *A. terreus* sont considérés comme les producteurs les plus élevés de métabolites secondaires extracellulaires, alors que les producteurs les plus faibles étaient *A. tamarii*, *A. rugulosus* en plus d'*A. oryzae*, dont les métabolites secondaires ne pouvaient pas être détectés par cette technique. Dans le cas des métabolites secondaires intracellulaires, les producteurs les plus importants étaient *A. flavus*, *A. nidulans* et *A. wentii* alors que les producteurs les plus faibles étaient *A. clavatus*, *A. tamarii* et *A. violaceus*. Toutes les espèces examinées pouvaient être distinguées d'après leurs profils de métabolites secondaires indiquant le rôle potentiel de ces métabolites secondaires dans la chimiotaxonomie d'*Aspergilli* (Abu - Seidah, 2003).

Quelques espèces d'*Aspergillus* et *Penicillium* producteurs de mycotoxines sont cités dans le Tableau 2 (Bennett 1987; Davis, 2001 ; Adams, 2002).

Tableau 2. Quelques mycotoxines synthétisées par *Aspergillus* et *Penicillium*.

| Mycotoxine | Organisme | Reference |
|-----------------------|---|--------------------------------------|
| Aflatoxine | <i>Aspergillus flavus</i> , <i>A. parasiticus</i> | Wilson <i>et al.</i> , 1968 |
| Aflatreme | <i>A. flavus</i> | TePaske <i>et al.</i> , 1990 |
| Austdiole | <i>A. ustus</i> | Kfir <i>et al.</i> , 1986 |
| Austamide | <i>A. ustus</i> | Kfir <i>et al.</i> , 1986 |
| Austocystine | <i>A. ustus</i> | Kfir <i>et al.</i> , 1986 |
| Brevianamide | <i>A. ustus</i> | Filtenborg <i>et al.</i> , 1983 |
| Citrinine | <i>A. carneus</i> , <i>A. terreus</i> , <i>Penicillium citrinum</i> , <i>P. hirsutum</i> , <i>P. verrucosum</i> | Krivobok <i>et al.</i> , 1987 |
| Citreoviridine | <i>A. terreus</i> , <i>P. citreoviride</i> | Sakabe <i>et al.</i> , 1964 |
| Cytochalasine E | <i>A. clavatus</i> | Keller-Schierlein et Kupfer, 1979 |
| Acide cyclopiazonique | <i>A. versicolor</i> | Filtenborg <i>et al.</i> , 1983 |
| Fumagilline | <i>A. fumigatus</i> | Assil et Sporns, 1991 |
| Gliotoxine | <i>A. fumigatus</i> | Richard <i>et al.</i> , 1989 |
| Islanditoxine | <i>P. islandicum</i> | Ueno, 1984 |
| Malformine | <i>A. niger</i> | Anderegg <i>et al.</i> , 1976 |
| Maltoryzine | <i>Aspergillus</i> spp. | Iizuka et Iida, 1962 |
| Ochratoxine | <i>A. ochraceus</i> , <i>P. viridictum</i> | Krivobok <i>et al.</i> , 1987 |
| Acide oxalique | <i>A. niger</i> | Pier et Richard, 1992 |
| Patuline | <i>A. clavatus</i> , <i>P. expansum</i> , <i>P.</i> <i>roquefortii</i> , <i>P. claviforme</i> , <i>P.</i> <i>griseofulvum</i> . | Hubbard <i>et al.</i> , 1977 |
| Acide penicillique | <i>A. ochraceus</i> | Elvidge <i>et al.</i> , 1977 |
| Penitreme | <i>P. crustosum</i> | Filtenborg <i>et al.</i> , 1983 |
| Rubratoxine | <i>P. crateriforme</i> (<i>rubrum</i>) | Wilson et Wilson, 1962 |
| Rubroskyrine | <i>Penicillium</i> spp. | Ueno, 1984 |
| Rubrosulphine | <i>P. viridicatum</i> | Carlton et Tuite, 1977 |
| Rugulosine | <i>P. brunneum</i> , <i>P. kloeckeri</i> , <i>P.</i> <i>rugulosum</i> | Frisvad, 1989 |
| Sterigmatocystine | <i>A. flavus</i> , <i>A. nidulans</i> , <i>A.</i> <i>versicolor</i> , <i>P. rugulosum</i> | Filtenborg <i>et al.</i> , 1983 |
| Tryptoquivalene | <i>A. clavatus</i> | Clardy <i>et al.</i> , 1975 |
| Verruculogene | <i>A. fumigatus</i> | Cole <i>et al.</i> , 1977 |
| Viopurpurine | <i>P. viridicatum</i> | Carlton et Tuite, 1977 |
| Viomelleine | <i>Aspergillus</i> spp., <i>P.</i> <i>aurantiogriseum</i> , <i>P. crustosum</i> , <i>P. viridicatum</i> | Filtenborg <i>et al.</i> , 1983 |
| Viriditoxine | <i>A. viridinutans</i> | Weisleder et Lillehoj, 1971 |

IV.4. Métabolites secondaires chez *A. ochraceus*

A. ochraceus NRRL 3174 est capable de produire plusieurs métabolites secondaires (Fig. 1). Cette souche a été rapportée pour produire la melleine, le 4-hydroxymelleine (Moore *et al.*, 1972), l'acide pénicillique et la 5,6 – dihydro acide pénicillique (Obana *et al.*, 1995), la

xanthomegnine, la viomelleine, la vioxanthine (Richard *et al.*, 1999 ; Frisvad et Thrane, 2002), l'asperlactone et l'isoasperlactone (Torres *et al.*, 1998) mais aussi les ochratoxines A, B et α (van Der Merwe *et al.*, 1965 ; Taniwaki *et al.*, 2003). Le méthyle- et l'éthyle esters d'ochratoxine A et B ont aussi été identifiés comme des composants mineurs des cultures d'*A. ochraceus* (Steyn et Holzapfel, 1967). L'aspyrone, la diaporthine, l'orthosporine, l'aspinonene, les aspindoles, le triendiol, les decanolides, les chlorocarolides, les ochrindoles, les métabolites de diketopiperazine, les circumdatins, les benzodiazepines, l'asperlicine et les aspergamides sont aussi produites par *A. ochraceus* (Durley *et al.*, 1975; Harris et Cape, 2001; Présagez *et al.*, 2002).

Bode *et al.* (2002) ont révélé la diversité des produits naturels en jouant sur les paramètres de culture d'un nombre limité de souches. L'utilisation de l'approche appelée l'OSMAC (One Strain- Many Compounds), a permis d'isoler plus de 100 composés qui appartiennent à plus de 25 classes structurales différentes issues de seulement 6 micro-organismes différents. Par exemple, par cette technique, plusieurs métabolites secondaires ont été isolés chez *A. ochraceus* DSM 7428 (Fig. 2). Cette approche représente un outil puissant pour élucider le métabolisme secondaire global chez un microorganisme donné. Les paramètres changés lors de la culture du microorganisme comprennent l'influence des rayons UV, de la température et d'autres facteurs biologiques (Watanabe *et al.*, 1982).

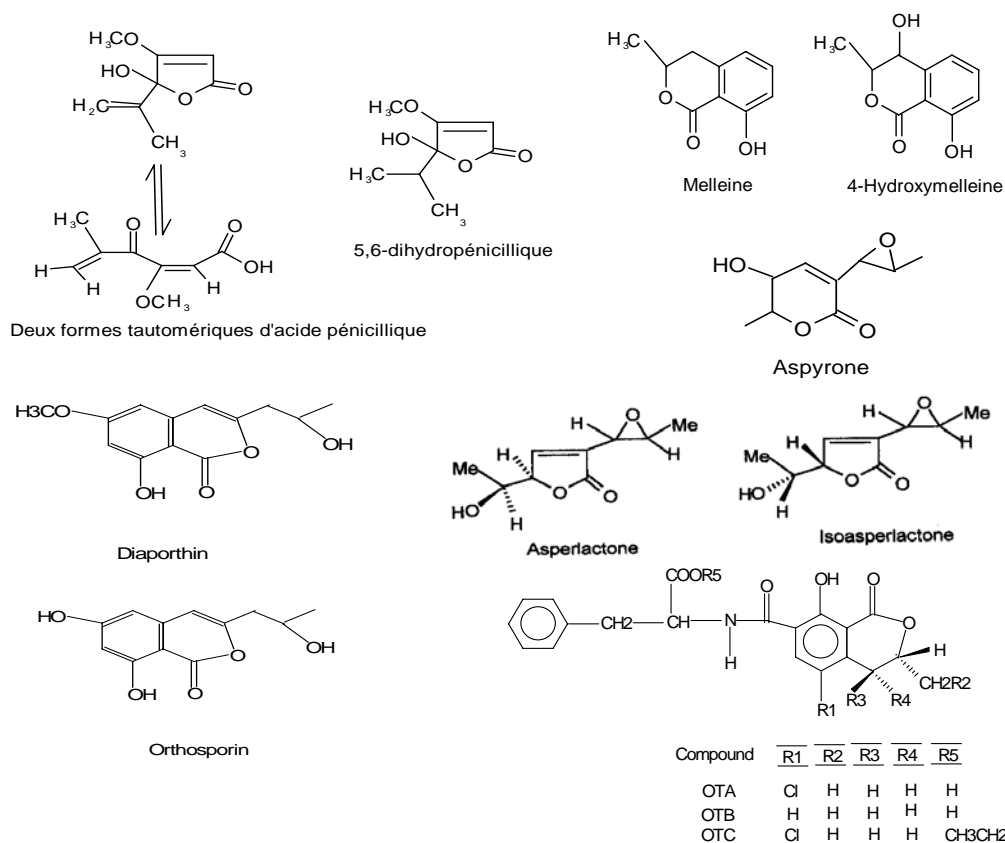


Fig. 1. Quelques métabolites secondaires synthétisés par *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174

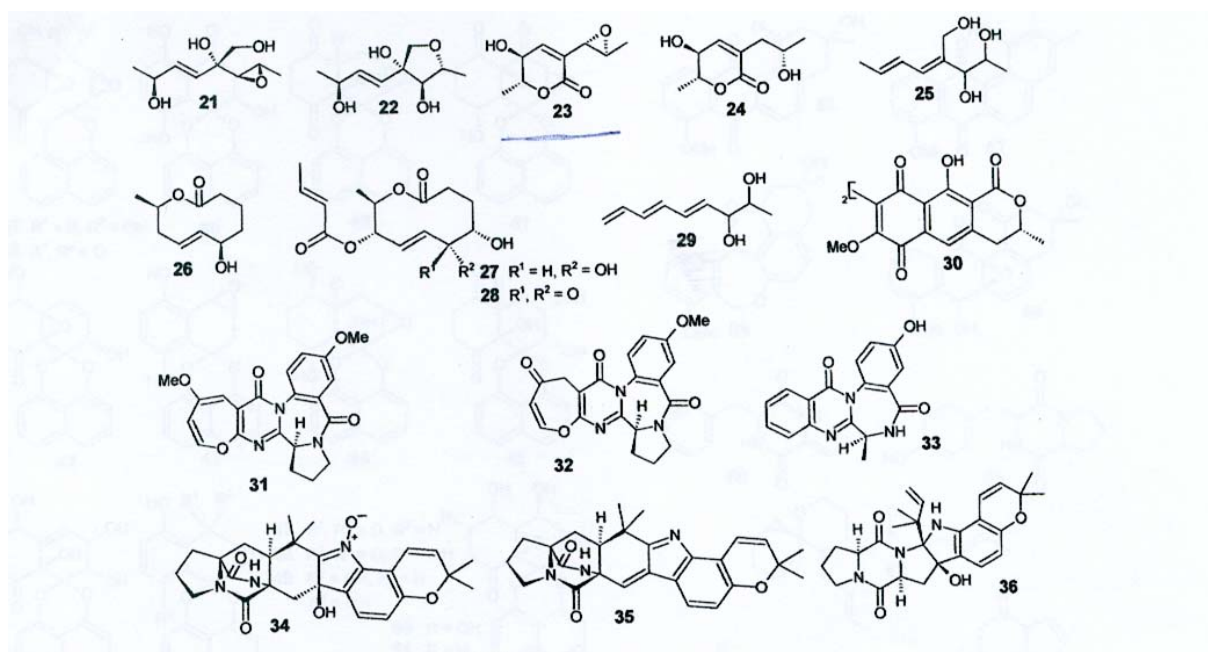


Fig. 2. Métabolites secondaires synthétisés par *Aspergillus ochraceus* DSM 7428
(Selon Bode *et al.*, 2002)

Aspinoene (21); Isoaspinonene (22); Asprrone (23); Dihydroaspyrone (24); Dientriol (25); Aspinolides A-C (26-28); Triendiol (29); Xanthomegnin (30); Asperloxin A-C (31-33); Aspergamides A-C (34-36).

La production de mycotoxine est favorisée par l'humidité et l'activité de l'eau (A_w) élevées. Elle a été détectée dans de nombreuses récoltes agricoles (Martins *et al.*, 2003, Pardo *et al.*, 2004). Haggblom (1982) a rapporté l'influence de la température (15-30°C) sur la production d'OTA sur les grains par deux isolats d' *A. ochraceus*. Cet auteur a suggéré que cette production d'OTA n'était pas associée avec la croissance rapide des champignons, et que les taux de croissance les plus élevés paraissaient plutôt restreindre la production d'OTA. De la même façon, Madhyastha *et al.* (1993) n'ont trouvé aucun rapport direct entre la croissance fongique et la production de l'OTA quand *A. ochraceus* NRRL 3174 est cultivé sur les grains à une A_w de 0,94. Mühlencoert *et al.* (2004) ont montré également que les oligo-éléments, les sources de carbone et d'azote affectent fortement la production d'OTA par *A. ochraceus* NRRL 3174. Aucune corrélation entre la production de la biomasse et la biosynthèse d'OTA n'a ainsi été observée.

IV.5. Les polykétides (ou polycétones)

IV. 5. 1. Définition

Les polykétides sont un groupe de métabolites secondaires, dont la diversité de leur structure et de leur activité biologique est remarquable (Gaitatzis *et al.*, 2002). Les polykétides sont connus pour être des molécules ayant des activités pharmacologiques variées, y compris des activités antimicrobiennes, antifongiques, antiparasitiques, antitumorales et aussi des propriétés agrochimiques (Shen, 2003). Le spectre large d'activité des polykétides les rend économiquement, cliniquement et industriellement les plus recherchés parmi de nombreuses molécules. Beaucoup de polykétides (Fig. 3) sont des composés bien connus, tels que l'érythromycine A, un antibiotique macrolide qui possède un spectre large, l'immunosuppressif FK506, les ochratoxines, l'acide pénicillique et la rapamycine. L'oléandomycine, la rifamycine B, la lovastatine, l'oxytétracycline, l'epothilone B et la reservatrolle sont parmi les polykétides découverts auparavant.

Les polykétides sont habituellement classés d'après leurs structures chimiques, selon le nombre d'unités acétates qui les composent en tri-, tétra-, penta-, hexa- et hépta-kétides. Quelques exemples typiques sont, le 6-méthyl acide salicylique (tétrakétide) de *P. patulum*, la melleine (pentakétide) d'*A. ochraceus* et d'*A. melleus*, et l'acide mycophénolique (heptakétide) de *P. brevicompactum* (Hopwood, 1997; Fujii *et al.*, 2001).

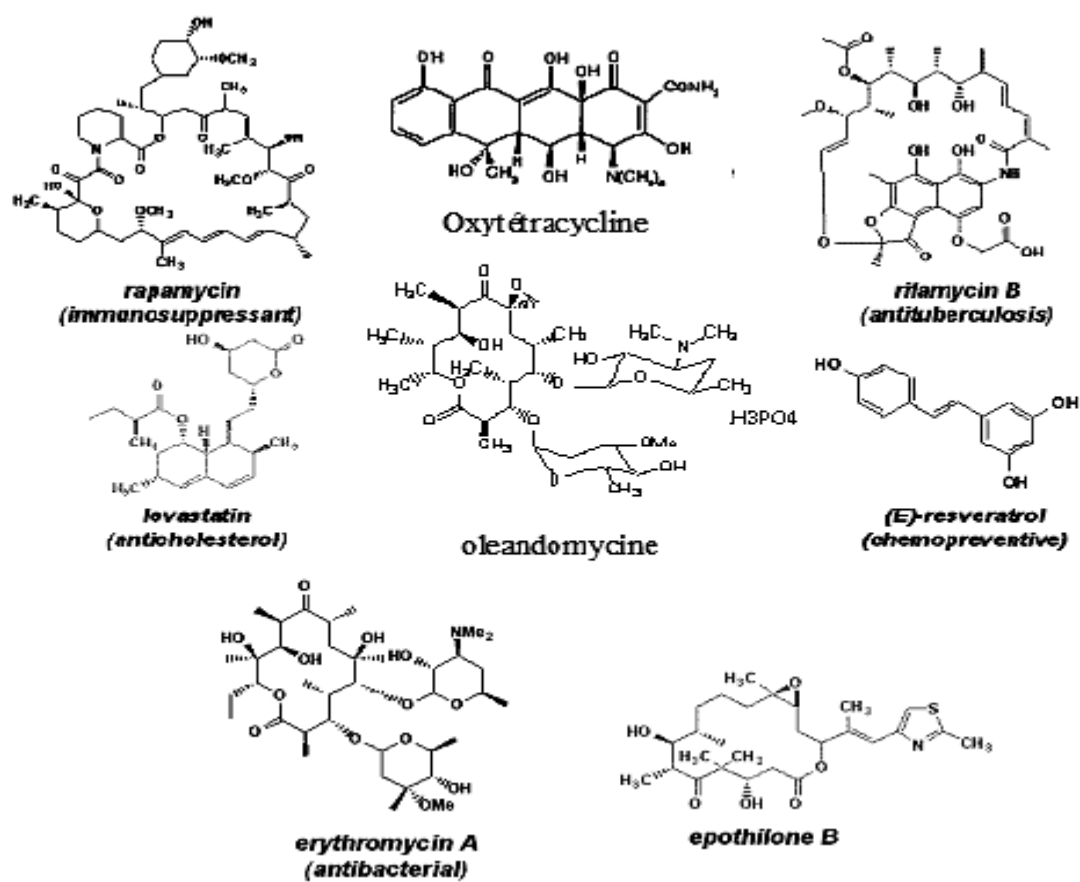


Fig. 3. Quelques exemples de polykétides

IV. 5.2. Biosynthèse de polykétides

Les étapes initiales de la biosynthèse des polykétides sont assurées par des polykétides synthases (PKS). La réaction de condensation des acyl-CoA suit le même principe que la biosynthèse des acides gras par des acides gras synthases (AGS). La différence réside dans le fait que chez les AGS chaque cycle est complet et répétitif, alors que chez les PKS certaines réactions de réduction ou de déshydratation peuvent être supprimées (Leistner, 1981; Hutchinson *et al.*, 2000; Gaitatzis *et al.*, 2001). Les polykétides fongiques dérivent exclusivement des unités acétyl-CoA contrairement aux polykétides bactériens qui peuvent incorporer également des unités propionyl, butyryl... (Hutchinson, 1995; Simpson, 1995) (Fig. 4). La chaîne ainsi produite après élongation peut être transformée par cyclisation, lactonisation, ou formation des thioésters ou amides (Vining, 1990). Toutes ces transformations aboutissent à la production d'une gamme plus large de produits biologiquement actifs (O'Hagan, 1991; O'Hagan, 1995; Rawlings, 1999).

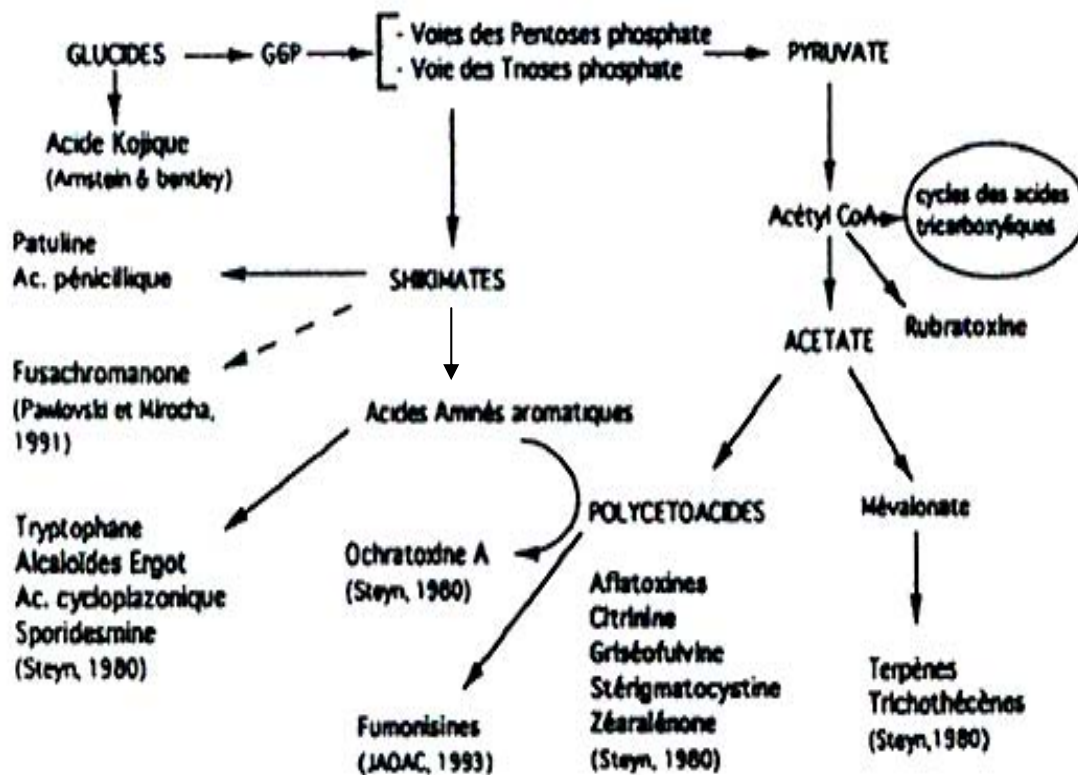


Fig. 4. Schéma de biosynthèse de certaines mycotoxines

IV. 5.3. Origine des précurseurs des polykétides fongiques

Le précurseur principal pour la biosynthèse des polykétides fongiques est l'acétyl-CoA. Une molécule Acétyl-CoA permet l'initiation du processus et chaque unité acétyl additionnée par la suite le sera sous forme de malonyl-CoA (Fig.5). L'acétyl-CoA peut avoir différentes origines.

La glycolyse est à l'origine de la plupart de l'acétyl-CoA produit dans les cellules de la moisissure (Weete, 1980). Dans le cytoplasme, la glycolyse produit l'acide pyruvique qui sera décarboxylé par la pyruvate déshydrogénase mitochondriale, en excréant l'acétyl-CoA dans la matrice mitochondriale (White *et al.*, 1978). Les acides gras synthétases (White *et al.*,

1978; Weete, 1980) et, vraisemblablement les polykétides synthétases (Hsich et Mateles, 1970), sont dans le cytoplasme. L'acétyl-CoA doit donc être disponible dans le cytosol pour satisfaire ces besoins, mais il ne peut pas traverser la barrière de la membrane mitochondriale. Il existe trois voies possibles pour que l'acétyl-CoA soit disponible dans le cytoplasme (Weete, 1980).

- (1) L'acétyl-CoA entre dans le cycle des acides tricarboxyliques dans lequel il se combine avec une molécule d'oxaloacétate pour former le citrate. Ce dernier peut traverser la membrane mitochondriale où il est scindé en oxaloacétate et acétyl-CoA dans le cytoplasme par la citrate lyase d'ATP.
- (2) la partie acétyl de l'acétyl-CoA peut être transportée à travers la membrane mitochondriale, facilitée par la carnitine. L'acétyl-CoA est alors régénéré dans le cytoplasme.
- (3) L'acétyl-CoA peut être hydrolysé dans la matrice mitochondriale, et l'acétate diffuse alors hors de la membrane où l'acétyl-CoA peut être facilement reformé par l'acétate thiokinase dans le cytoplasme. Il semble que le premier itinéraire soit le plus probable (White *et al.*, 1978).

L'acétyl-CoA peut également être régénéré par β -oxydation des acides gras dans la mitochondrie. Il peut également provenir de l'acétate exogène après transport vers l'intérieur de la cellule. Il est converti en acétyl-CoA dans le cytoplasme par l'acétate thiokinase (Weete, 1980). Une étude sur la biosynthèse de l'aflatoxine (Hsich et Mateles, 1970) a indiqué que l'acétate marqué a été incorporé dans l'aflatoxine plus rapidement que le glucose. L'étude a aussi montré que l'aflatoxine a incorporé exclusivement de l'acétate marqué jusqu'à ce que la plupart de l'acétate exogène ait été consommé, et ensuite seulement le carbone provenant du glucose a commencé à être incorporés dans la toxine.

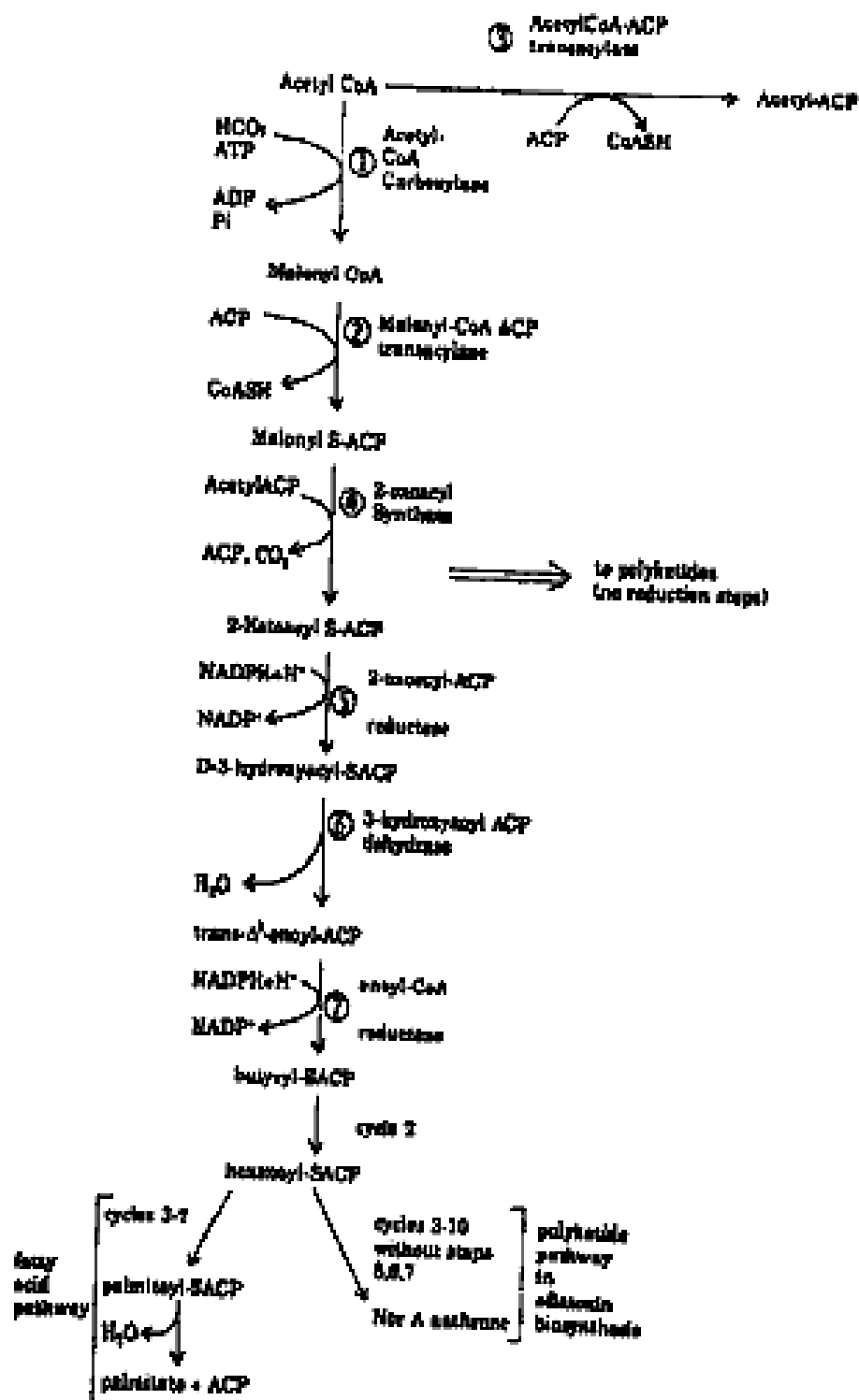
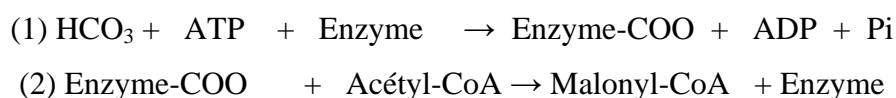


Fig. 5. Bioconversion d'acetyl CoA et malonyl CoA aux polykétides et acides gras.
(Selon, Mathews et van Holde, 1990)

L'acétyl-CoA ainsi formé est converti en malonyl-CoA par l'acétyl-CoA carboxylase. Cette réaction exige la présence de la biotine, du Mn^{2+} et du bicarbonate. La réaction se fait en deux étapes comme mentionnée ci-dessous (White *et al.*, 1978; Weete, 1980):



La carboxylation de l'acétyl-CoA est communément considérée comme une étape limitante dans la biosynthèse des acides gras (Vagelos, 1964). L'acétyl-CoA carboxylase est un site pour plusieurs mécanismes de contrôle en rapport avec la biosynthèse d'acides gras et probablement aussi des polykétides. L'enzyme est activé par les composés intermédiaires du cycle des acides tricarboxyliques, le citrate et l'isocitrate, à travers un contrôle allostérique (Rasmussen et Klein, 1967). L'activité de l'acétyl-CoA carboxylase est aussi inhibée par le malonyl-CoA (Lust et Lynen, 1968).

IV.6. Isolement, purification et caractérisation des métabolites secondaires

Quelques métabolites fongiques sont retenus dans le mycélium fongique, alors que les autres sont excrétés dans le milieu de culture. Les métabolites secondaires peuvent être obtenus à partir de la matière biologique suite à une extraction avec des solvants tel que l'éther de pétrole, le chloroforme, l'acétate d'éthyle, le méthanol, etc. Plusieurs solvants de polarité croissante peuvent être utilisés. Donc, la matière lipidique (les cires, les acides gras, les stérols, les caroténoïdes et les terpénoïdes simples) peut être extraite avec des solvants non-polaires tel que l'éther de pétrole, mais les substances plus polaires tels que les alcaloïdes et les glycosides sont extraites avec du méthanol, du méthanol - eau ou même avec de l'eau chaude. Beaucoup d'alcaloïdes sont présents, comme leurs sels, avec des acides existants naturellement tels que l'acide tartrique.

La recherche de nouveaux métabolites fongiques peut être réalisée en se basant sur deux critères différents :

- a- Recherche de nouvelles activités biologiques. Dans ce cas, les composés actifs sont isolés et purifiés et leurs structures chimiques sont ensuite déterminées par des méthodes spectroscopiques (IR, MS et RMN).

b- Purification de métabolites ayant des structures chimiques nouvelles et originales.

Dans ce cas les molécules retenues seront testées quand à leurs activités biologiques ou leur capacité d'être transformées en molécules actives.

Les techniques de purification utilisées sont diverses et variées. On peut citer à titre d'exemple l'extraction liquide/liquide ou liquide / solide, la chromatographie sur couche mince (CCM), la chromatographie liquide (à basse ou à haute pression). Les techniques chromatographiques sont très puissantes par la diversité des supports de séparation mise sur le marché. Ces techniques peuvent être utilisées en semi-préparative ou en préparative selon les besoins. Une fois les produits séparés, les analyses spectrales permettent de rassembler les données nécessaires pour établir les structures chimiques. Parmi ces analyses spectrales on peut citer l'infra-rouge (IR), le spectre de masse (MS) et la résonance magnétique nucléaire (RMN) du ^1H ou du ^{13}C

IV.6.1. Spectrométrie de masse (détection et identification)

La spectrométrie de masse permet d'avoir les masses moléculaires et même les formules chimiques des métabolites avec une grande certitude (masse à haute résolution). Les profils de masse obtenus par fragmentation progressive des molécules permettent parfois de déduire la présence de certaines structures chimiques et de faire des comparaisons avec des profils de molécules répertoriées. La technique de "nanospray" a également permis la détection et l'analyse des métabolites même à l'état de traces.

Le couplage LC-MS (liquide chromatography-mass spectrometry) permet aujourd'hui la détermination des masses moléculaires de tous les composants d'un profil chromatographique. (Aschroft, 1997 ; Jørgensen et Vahl, 1999 ; Frisvad et Thrane, 1987; Rosenberg *et al.*, 1998; Jørgensen et Vahl, 1999; Lin et Shu, 2002). La spectrométrie de masse peut être également couplée à la chromatographie en phase gazeuse (Cartes, 1990). Ces nouveaux appareils GC/MS, qu'il est préférable de désigner par les termes « GC/MS compacts » ou « GC/MS intégrés » ont progressivement accru leurs performances techniques. Aujourd'hui, les meilleurs d'entre eux assurent la plupart des fonctions d'analyse – séparation, identification et dosage de substances organiques dans des mélanges complexes – auparavant effectuées avec des appareils plus volumineux, d'emploi plus complexe, plus fragiles à l'usage, et souvent plus coûteux.

IV.6.2. Résonance magnétique nucléaire (RMN)

La RMN dont les premiers travaux, vers 1945, sont dus aux physiciens Bloch et Purcell, est très vite devenue une méthode spectroscopique polyvalente irremplaçable dans divers secteurs de la chimie. La RMN est utile aussi bien en analyse quantitative qu'en analyse structurale, mais c'est surtout dans ce dernier domaine qu'elle fait preuve. Très performante pour obtenir des renseignements qualitatifs et structuraux sur les composés moléculaires, elle revêt donc une importance pratique toute particulière en chimie organique et en biochimie. Utilisée en complément des autres méthodes de spectroscopie optique classiques et de la spectrométrie de masse, elle permet de localiser les atomes, de préciser la formule développée et la stéréochimie du composé étudié, voire sa conformation privilégiée (Rouessac et Rouessac, 1995). Elle est devenue pour ces raisons une des techniques majeures d'étude des molécules biologiques.

IV.7. Effet des facteurs environnementaux sur la production des métabolites secondaires

La production des métabolites secondaires peut être réalisée sous trois conditions. Premièrement, il est nécessaire d'avoir des usines cellulaires pour synthétiser la molécule, c'est-à-dire de la biomasse; deuxièmement, les précurseurs, doit être présents; et troisièmement, les enzymes capables de transformer ces précurseurs, doivent être aussi présents et actifs (Voelker et Altaba, 2001).

IV.7.1. Régulation par la source de carbone

Le choix de la source du carbone influence fortement le métabolisme secondaire et par conséquent la production d'antibiotique ou de mycotoxine (Martain et Demain, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995). Les substrats rapidement métabolisés tels que le glucose peuvent souvent réaliser des taux de croissance cellulaire maximale, mais sont connus pour inhiber la production de nombreux métabolites secondaires. Cette "répression du catabolite" semble être due aux intermédiaires, produits du catabolisme rapide du glucose interférant avec les enzymes dans le processus du métabolisme secondaire. Gallo et Katz (1972), par exemple, ont observé que l'enzyme qui catalyse la formation du cycle du phénoxazinone d'actinomycine a été inhibée par le glucose. Dans nombreux micro-organismes, le glucose provoque une répression de la formation de plusieurs antibiotiques amino-glycosidiques (amino glycoside antibiotiques) produits par les *actinomycètes*.

(Stryptomycine, kanamycine, istamycine et néomycine) par une répression des enzymes de biosynthèse (Demain, 1989; Piepersberg et Distler, 1997). Dans quelques micro-organismes, l'effet inhibiteur du glucose sur la production des métabolites secondaires est pH dépendant, il est dû à l'acidification par suite de l'accumulation des acides organiques (Solé *et al.*, 2000).

Les sucres simples tels que le glucose, le fructose, le saccharose, et le sorbitol comme uniques sources du carbone révèlent une grande croissance fongique, une bonne sporulation et une meilleure production de l'aflatoxine (Abdollahi et Buchanan, 1981; Kacholz et Demain, 1983; Buchanan et Stahl, 1984; Luchese et Harrigan, 1993; Liu et Chu, 1998). Par contre, les peptones (Feng et Leonard, 1998) et les sucres plus complexes comme le galactose, le xylose, le mannitol et le lactose (Kacholz et Demain, 1983) ne permettent pas bien la production de l'aflatoxine. Les substrats lentement assimilés tels que l'amidon (Basak et Majumdar, 1973) ont des meilleurs rendements de production d'antibiotiques chez les champignons.

Les sources de carbone telles que l'amidon, la dextrine, le glucose et le saccharose sont communément utilisées comme des substrats de croissance pour produire des enzymes, des antibiotiques et d'autres métabolites secondaires par la fermentation. Cependant, la production est fréquemment limitée dû à un effet négatif exercé par la source du carbone (Sanchez et Demain, 2002).

IV.7.2. Régulation par la source d'azote

La source d'azote régule le métabolisme secondaire, comme la source de carbone. Les niveaux élevés de l'azote répriment la production d'antibiotiques pendant l'iodophase (Ahronowitz, 1980; Doull et Vining, 1990; Spizec et Tichy, 1995). Junker *et al.* (1998) ont trouvé pour leur part que le contrôle de la concentration des ions ammonium était important pour la production de métabolite secondaire.

L'utilisation des acides aminés comme sources d'azote, peut inhiber fortement ou améliorer la biosynthèse de certains métabolites secondaires (Ahronowitz, 1980; Martin et Demain, 1980). La méthionine est bien connue pour son effet stimulateur sur la biosynthèse de céphalosporine C, quand elle est ajoutée pendant la phase de croissance de *Cephalosporium acremonium* (Martain et Demain, 1980). Ces effets bénéfiques peuvent être

dus à un rôle inducteur jouer par l'acide aminé ou simplement par un apport accru en précurseurs.

Le choix de la source d'azote utilisée dans le milieu de croissance peut avoir des effets différents sur la production de la stérigmatocystine et de l'aflatoxine chez différentes espèces d'*Aspergillus*. Le nitrate comme source d'azote réprime la biosynthèse des intermédiaires de l'aflatoxine chez *A. parasiticus* (Kacholz et Demain, 1983; Niehaus et Jiang, 1989) mais augmente la production de la stérigmatocystine chez *A. nidulans* (Feng et Leonard, 1998). Ces auteurs n'ont observé aucune production de la stérigmatocystine dans les milieux contenant de l'ammonium. Les autres études indiquent que la production de la stérigmatocystine et de l'aflatoxine augmente dans les milieux à base d'ammonium et baisse dans le milieu à base de nitrate (Keller *et al.*, 1997; Morrice *et al.*, 1998). D'autres auteurs ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de culture augmente la production des métabolites secondaires telles que la stryptomycine, la néomycine et la gentamicine. Cet effet positif est dû à la conversion de l'ammonium en glutamine, utilisée dans la formation des précurseurs (Gonzalez *et al.*, 1995).

La source d'azote n'influence pas seulement la production du mycotoxine mais aussi la croissance chez l'*Aspergillus* spp. Ainsi chez *A. flavus* le nitrate permet un développement sclérotique alors que l'ammonium l'inhibe (Bennett *et al.*, 1979)..

Le glutamate est le fournisseur de l'azote pour la biosynthèse de 85 % des composés azotés de la cellule alors que la glutamine peut représenter la source de 15 % des molécules azotées. Ces deux fournisseurs d'azote peuvent être synthétisés à partir d'ammonium par la glutamate déshydrogénase (GDH) et la glutamine synthétase (GS), par conséquent l'ammonium est la troisième molécule du métabolisme central d'azote après le glutamate et la glutamine. Une autre réaction catalysée par la glutamate synthase (GOGAT) est capable de transformer le glutamine en glutamate (Reitzer, 1996). L'acide glutamique et l'acide aspartique sont considérés comme des sources riches en azote et sont utilisés préférentiellement par la cellule (Da Silva *et al.*, 2001); l'ammonium, le glutamate et la glutamine sont eux préférentiellement utilisés par les champignons (Magasanik, 1992; Ter Schure *et al.*, 2000).

Seuls le glutamate et l'histidine favorisent la biosynthèse de la lovastatine (Szakacs *et al.*, 1998; Manzoni *et al.*, 1999). La glutamate dehydrogenase stimule la formation de l'aflatoxine

par la formation d'un kétooglutarate qui inhibe le cycle d'acide tricarboxylique (Bhatnagar *et al.*, 1986). L'influence des sources de l'azote sur le métabolisme secondaire a été illustrée pour la biosynthèse de la fumonisine B1 chez *Gibberella fujikuroi* (Shim et Woloshuk, 1999), de la stérigmatocystine chez *A. nidulans* (Feng et Leonard, 1998), de l'aflatoxine chez *A. parasiticus* (Luchese et Harrigan, 1993; Chang *et al.*, 1995) et de la pénicilline chez *P. chrysogenum* (Feng *et al.*, 1994).

D'après Ferreira (1967), l'acide glutamique (ou la proline) exerce un effet inducteur sur la biosynthèse d'OTA dans la culture. La proline convertie en acide glutamique par pyrroline -5-acide carboxylique dans beaucoup de micro-organismes (Rodwell, 1969). Cependant, les autres acides aminés sont aussi connus pour être convertis en acide glutamique mais ils n'effectuent pas la production de mycotoxine (Ferreira, 1968). De plus, la proline et l'acide glutamique stimulent la synthèse d'OTA par *P. verrucosum* (Pitt, 1987).

IV.7.3. Régulation par la source des phosphates

Le phosphate, bien qu'essentiel pour la croissance, peut, à certaines concentrations, supprimer le métabolisme secondaire, inhibant, par exemple, les phosphatases et les oxygénases (Spizek et Tichy, 1995). De façon intéressante, le niveau d'adénosine triphosphate (ATP) chute fortement avant le démarrage du métabolisme secondaire (Cardova *et al.*, 1976). Le phosphate inorganique réprime la synthèse de la phosphatase, en augmentant le niveau d'ATP. Behal *et al.* (1979) ont montré que le phosphate réprime le métabolisme secondaire. La stimulation de la phase de la croissance, si le phosphate est ajouté, peut engendrer l'inhibition du métabolisme secondaire. Par contre la production de phénazine par *Pseudomonas phenazinium* ne semble pas être régulée par le niveau du phosphate (Messenger et Turner, 1983).

La formation de nombreux métabolites secondaires est inhibée par la concentration du phosphate inorganique (Weinberg, 1978). L'effet du phosphate sur la production d'un métabolite secondaire a été expliqué par plusieurs mécanismes (Martin, 1977).

- (a) Le phosphate favorise le métabolisme fondamental; un changement dans le métabolisme fondamental réprime le métabolisme secondaire.
- (b) le phosphate influence la voie catabolique des hydrates de carbone.

- (c) le phosphate peut limiter la synthèse de certains inducteurs de la voie de biosynthétique des antibiotiques.
- (d) le phosphate inhibe la formation des précurseurs d'antibiotiques.
- (e) le phosphate inhibe ou réprime les phosphatases nécessaires pour la biosynthèse de certains antibiotiques.
- (f) le phosphate supprime la production d'antibiotiques en privant la cellule de certains métaux essentiels.

IV.8. Futures tendances dans la production des métabolites secondaires

(1) Enquête de nouveaux composés biologiquement actifs

Les nouvelles avancées dans les séparations chimiques et les technologies de la caractérisation ont considérablement augmenté le taux de détection des médicaments microbiens. Il est possible d'identifier de nouveaux composés actifs aux concentrations de l'ordre du picomolaire et les nouvelles avancées influenceront certainement nos idées au sujet du contrôle de surproduction des métabolites secondaires et de la physiologie totale des producteurs dans un futur proche.

(2) Enquête de nouvelles activités biologiques de composés connus

Lorsque les composés, avec des activités antibiotiques déjà connues, ont de nouveau été étudiés, ils ont révélé des activités biologiques supplémentaires comme la cyclosporine C, par exemple. *Ceci représente une voie intéressante en innovant au niveau des cibles de la'action des médicaments.*

(3) Biotransformation des métabolites secondaires

La biotransformation des métabolites secondaires existants peut mener aux composés qui montrent plus de propriétés favorables, par exemple, une activité biologique plus élevée, une solubilité dans l'eau plus élevée, une toxicité inférieure etc.

(4) Etude de la résistance aux métabolites secondaires biologiquement actifs

Les mécanismes de résistance paraissent être semblables dans les producteurs de métabolites secondaires et les microorganismes cliniquement résistants. Il peut être attendu

que les mécanismes supplémentaires soient trouvés dans les deux types. Les microorganismes deviendront sûrement de plus en plus importantes.

(5) Approches biologiques et physiologiques moléculaires combinées

Il est clair que les outils de la biologie moléculaire et de la génétique permettent de répondre à beaucoup de questions à propos du contrôle des mécanismes du métabolisme secondaire. Cependant, l'approche physiologique ne doit pas être négligée et seule la combinaison des deux peut être satisfaisante.

MATERIEL ET METHODES

I. Microorganismes et réactifs

I.1. Souches

Les souches utilisées dans cette étude étaient: *Aspergillus ochraceus* Wilhelm NRRL 3174, *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* CIP 7625, *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 (mc2 155), *Listeria monocytogenes* (Institut Pasteur d'Alger), *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91, *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* No 1882, *Agrobacterium tumefaciens* No 2410, *Mucor ramanniamus* NRRL 1829 et *Saccharomyces cerevisiae* ATCC 4226.

I.2. Liste des produits utilisés

- Ethanole (Fluka)
- D(+)-Glucose anhydre (Fluka)
- Nitrate de sodium (Fluka)
- Extrait de levure (Fluka)
- Extrait de malt (Fluka)
- Agar (Fluka)
- Sulfate d'ammonium (Fluka)
- Nitrate d'ammonium (Fluka)
- Sulfate de magnésium heptahydraté (Fluka)
- Phosphate de potassium monohydrogéné (Fluka)
- Phosphate de potassium dihydrogéné (Fluka)
- Chlorure de potassium (Fluka)
- Chlorure d'ammonium (Fluka)
- Chloroforme (Fisher)
- Méthanol pour CLHP (Fisher)
- Méthanol pour analyse (Fluka)
- Acétonitrile pour CLHP (Fisher)
- Acide chlorhydrique (Fluka)
- Acide sulfurique concentré (Fluka)
- Hydroxyde de sodium (Fluka)
- Acide acétique (Sigma)

- Acide succinique (Acros)
- Acide citrique (anhydre) (Sigma)
- Acide DL-malique 99 % (Fisher)
- Acide oxalique 99,8 (Prolabo)
- Acide 3,5 dinitrosalicylique 98 % (Acros)
- L-méthionine 98 % (Sigma)
- Acide L-glutamique 99 %, anhydre (Acros)
- L-lysine-monohydrochloride (Merck)
- L-alanine 99 % (Acros)
- L-phenylalanine 98.5 % (Acros)
- Trypton Sel (Fisher)
- Tween 80 (Fisher)
- Phénol (Fisher)
- Sulfite de Na (Na_2SO_3) (Fluka)
- Tartrate de Na (Fluka)
- Gel de silice GF 254 (Merck)
- Toluène (Fluka)
- Acétate d'éthyle (Fluka)
- Acide formique (Fluka)
- Galactose (Fluka)
- Fructose (Fluka)
- Saccharose (Fluka)
- Maltose (Fluka)
- Glycérol (Fluka)
- Amidon soluble (Fluka)
- Dextrines (Fluka)
- Borate de sodium (Fluka)
- Molybdate d'ammonium (Fluka)
- Sulfate de fer (Fluka)
- Sulfate de cuivre (Fluka)
- Sulfate de manganèse (Fluka)
- Sulfate de zinc (Fluka)

II. Appareils

- pH-mètre (Corning-EEL modèle 109)
- Chromatographie liquide à haute performance (CLHP) (BIO-TEK, Milan, Italie) avec colonne C18 et logiciel (PC) d'exploitation (Kroma 3000)
- Spectrophotomètre UV lambda max 481 LC (Waters)
- Autoclave
- Congélateur à – 80 °C (Jouan)
- Table d'agitation orbitale (Certomat RB Braun, Unimax 2010, Heidolph)
- Bain-marie (Bioblock Scientific, Polystat I ref. 33194 220 V)
- Agitateur giratoire pour fioles de culture (Braun)
- Centrifugeuse (Jouan)
- Ultracentrifugeuse (Beckman L 550 OB)
- Microcentrifugeuse: 112, Sigma
- Balance de précision (OSI, M-220 D, Drnver Instrument)
- Balance de pesé: Sartorius B 610 S, (Mettler, type B6C 200, Mettler E Mettler)
- Etuve à 25°C (Memmert Osi); étuve à 30 °C (Héraeus).
- Microscope (Leica, Leitz DM RB)
- Homogénéisateur (Ultra Thurax)
- Spectrophotomètre UV-visible (Philips PU 8600)

III. Milieux de cultures

III.1. Milieu synthétique

La composition de ce milieu est la suivante :

Solution A

| | |
|--|---------|
| NH ₄ NO ₃ | 3 g/L |
| K ₂ HPO ₄ | 26 g/L |
| KCl | 1 g/L |
| Mg SO ₄ , 7 H ₂ O..... | 1 g/L |
| Solution minérale..... | 10 ml/L |
| Agar | 15 g/L |

Le pH est ajusté à 6,5 avec 6 N HCl.

Solution B

Glucose100 g/500 mL

Les deux solutions sont stérilisées séparément à 121 °C pendant 20 min. La préparation du milieu définitif consiste à mélanger 75 mL de la solution A et 25 mL de la solution B dans des Erlenmeyers de 250 mL.

La nature et la concentration des sources de carbone et d'azote sont modifiées suivant le but des expériences.

- Solution minérale

Borate de sodium ($\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....70 mg/L
 Molybdate d'ammonium ($(\text{NH}_4)_6 \text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$).....50 mg/L
 Sulfate de fer ($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....1000 mg/L
 Sulfate de cuivre ($\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$).....30 mg/L
 Sulfate de manganèse ($\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$).....11 mg/L
 Sulfate de zinc ($\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$).....1760 mg/L

Le pH est ajusté à 2 avec 6 N HCl.

III.2. Préparation de la solution Trypton sel- Tween (TSTW, 100 mL)

Cette solution est utilisée pour la préparation de la suspension de spores avant la mutation.

Trypton Sel0,95 g
 Tween 803,3 µL

Le volume final est complété à 100 mL avec de l'eau bidistillée puis la solution est autoclavée.

III.3. Milieu ISP2 (International *Streptomyces* Project 2)

Le milieu ISP2 est utilisé pour tester l'activité biologique des métabolites secondaires purifiés.

Extrait de levure.....4 g
 Extrait de malt..... 10 g
 Glucose..... 4 g
 Agar..... 12 g
 Eau distillée.....qsp : 1 L et ajuster le pH à 7,2 avec 4 N NaOH.

Autoclaver 20 min à 120 °C.

IV. Obtention des mutants

IV.1. Mutation aux UV

Dans un tube Eppendorf, 975 µl de TSTW sont ajoutés à 25 µl d' *A. ochraceus* ($4 \cdot 10^8$ sp ml⁻¹). La concentration finale est de 10^7 sp ml⁻¹. Cette suspension est exposée aux UV ($\lambda = 254$ nm) sous agitation et à l'obscurité. Des prélèvements de 20 µl sont alors effectués dans des tubes Eppendorf stériles toutes les 30 secondes pendant 4 minutes. Puis, 980 µl de TSTW sont ajoutés. 100 µl de chaque prélèvement sont ensemencés sur milieu synthétique gélosé et les boîtes de Pétri sont incubées dans l'étuve à 25 °C. Les boîtes sont examinées sous UV ($\lambda_{\text{max}} = 365$ nm). Toute colonie ne présentant pas de fluorescence bleu est considérée comme mutant non producteur d'OTA. Tous les présumés mutants sont, par la suite, repiqués plusieurs fois sur le même milieu. La non production d'OTA est vérifiée par la suite par HPLC après culture en milieu liquide pendant 13 jours sans agitation à une température de 25 °C.

V. Condition de culture

Le mutant *A. ochraceus* M18 (400 µl), $2,3 \times 10^8$ sp ml⁻¹, a été ensemencé dans des Erlenmeyers 250 ml contenant un milieu synthétique liquide (100 ml). Les cultures sont menées à 25 °C sans agitation. Lorsque la cinétique de production des métabolites est suivie, des prélèvements ont été effectués tous les deux jours, pendant 17 jours. La composition du milieu en source de carbone ou en source d'azote peut être variable selon les objectifs de l'expérience. Lorsque c'est nécessaire, ceci est expliqué dans la partie résultat.

VI. Méthodes analytiques

VI.1. Estimation de la biomasse

La concentration cellulaire a été exprimée en poids cellulaire sec après filtration sur une membrane millipore 0.45 µm. Le volume du liquide plus le mycélium est mesuré (V en ml) puis filtré entièrement sur un filtre préalablement séché et taré (m_0 en g). Le mycélium retenu sur le filtre est rincé avec de l'eau distillée, puis l'ensemble est remis au four 105° C pendant 24 h. Le poids (m en g) est déterminé après refroidissement dans un dessiccateur. Le poids sec (PS) est calculé selon l'équation suivante:

$$PS = (m - m_0) 1000 / V \quad \text{g/L}$$

VI.2. Dosage des substrats

VI.2.1. Dosage de glucose

Principe

Ce dosage est basé sur l'action réductrice du glucose sur l'acide dinitrosalicylique en présence de soude. Le phénol favorise la coloration (Meller, 1959).

Réactif de Meller

- Acide dinitrosalicylique 20 g
- Phénol 4 g
- Sulfite de Na ($\text{Na}_2 \text{SO}_3$) 1 g
- Tartrate de Na 400 g

Le tout est mélangé dans un litre de NaOH 2% (0,5 N) et chauffé légèrement pour dissoudre tous les constituants. La solution est ensuite complétée à 2 L avec de l'eau distillée. Le réactif peut être stocké pendant 6 mois à l'abri de la lumière.

Protocole

3 ml du réactif de Meller sont mélangés avec 2 ml de l'échantillon à doser, et mis dans un bain-marie bouillant pendant 15 min. Les tubes sont ensuite refroidis pendant 30 min à 4°C. La lecture est réalisée par mesure de l'absorbance à 640 nm. La courbe d'étalonnage est réalisée à l'aide d'une série de concentrations allant de 0 à 0,8 g/l (Fig.6).

VI.2.2. Dosage des dextrines

Le dosage des dextrines est réalisé par la méthode décrite par Hanson et Phillips (1981). Elle permet de déterminer la concentration en glucides totaux. Après hydrolyse acide des dextrines par l'acide sulfurique, les glucides ainsi libérés réagissent avec le phénol, provoquant la formation d'une coloration jaune.

Réactifs

- Phénol 5%
- Acide sulfurique concentré

Protocole

Dans un tube à essai, 1 ml de phénol à 5% est ajouté à 1 ml de l'échantillon à analyser. Après agitation rapide, 5 ml d'acide sulfurique concentré sont additionnés. Après agitation, on laisse reposer 10 min à température ambiante. Les tubes sont placés ensuite dans un bain-

marie à 25 °C pendant 15 min. L'absorbance est lue à 488 nm contre un blanc contenant de l'eau distillée et préparé dans les mêmes conditions que les échantillons.

Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations de maltose allant de 0 à 100 mg/l (Fig. 7).

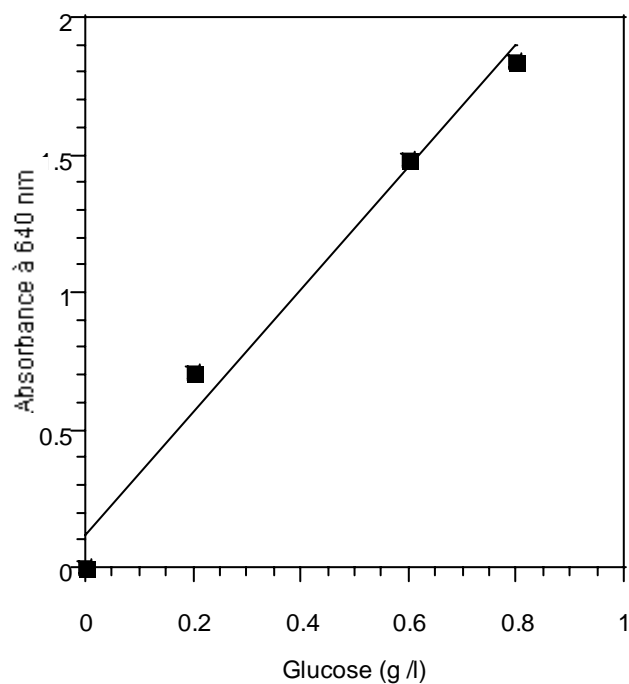


Fig. 6. Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose par spectrophotomètre

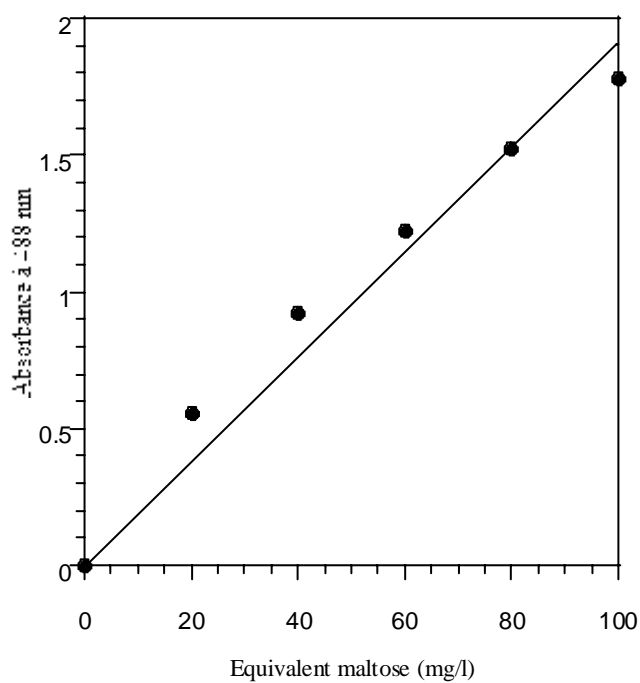


Fig. 7. Courbe d'étalonnage pour le dosage des dextrines par spectrophotomètre

VI.3. Dosage par HPLC (glucose, ac. acétique, ac. succinique, ac. citrique, ac. oxalique et ac. malique)

Les concentrations en glucose, ac. acétique, ac. succinique, ac. citrique, ac. oxalique et ac. malique ont été mesurées par chromatographie liquide à haute performance (CLHP). La colonne utilisée est une Aminex[®] HPX-87H Bio rad (garnissage cationique H⁺) de dimension 30 cm x 7,8 mm, précédée d'une colonne de garde Bio rad (H⁺). Le solvant est une solution d'acide sulfurique à 0,005 M (dégazé à l'hélium) élué à un débit de 0,4 ml/min par une pompe P1000XR (Thermo Separation Products).

Le système est également composé d'un injecteur automatique AS100 avec une boucle d'injection de 20 µl, un réfractomètre IV de Thermo Separation Products et un ordinateur pour l'acquisition des données. La séparation se fait à 40 °C. Le logiciel, Borwin V 1,2, permet de calculer la surface des pics détectés. Les échantillons sont préalablement déféqués selon la méthode suivante:

Afin d'éliminer les protéines et les impuretés pouvant encrasser la colonne, les échantillons subissent une défécation. On mélange 0,8 ml de l'échantillon avec 0,1 ml d'une solution d'hydroxyde de baryum Ba (OH)₂ (0,3 N) et 0,1 ml de sulfate de zinc (5%). Après 10 minutes, les échantillons sont centrifugés. Le surnageant est dilué pour obtenir des concentrations inférieures ou égales à 25 g/l pour les sucres et à 4 g/l pour l'éthanol et les acides organiques. Une courbe d'étalonnage est réalisée avec une série de concentrations (en g/l) de glucose (Fig.8), ac. acétique (Fig.9), ac. succinique (Fig.10), ac. citrique (Fig.11), ac. oxalique (Fig.12) et ac. malique (Fig.13).

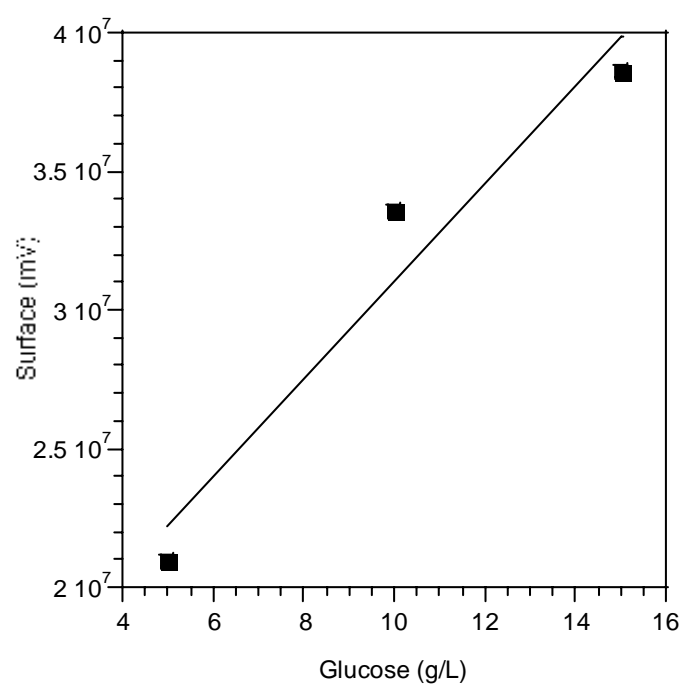


Fig. 8. Courbe d'étalonnage pour le dosage du glucose par HPLC

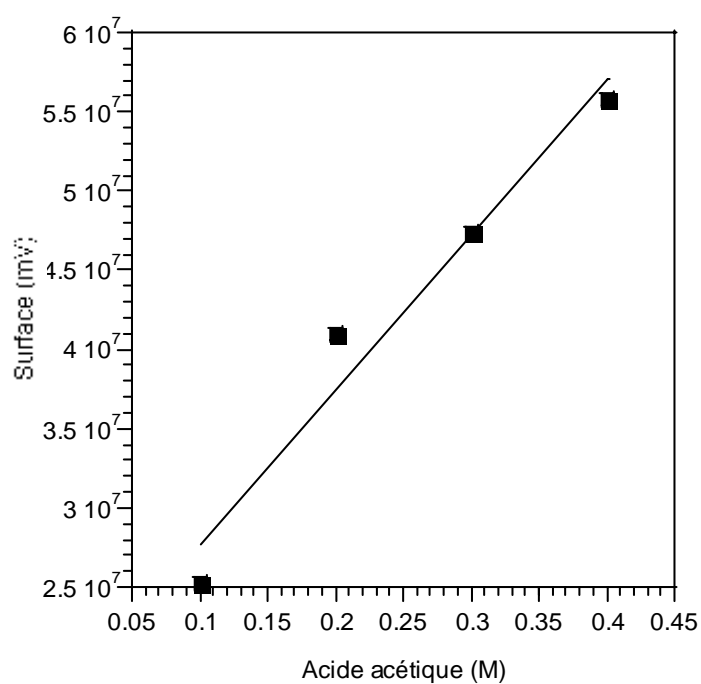


Fig. 9. Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide acétique par HPLC

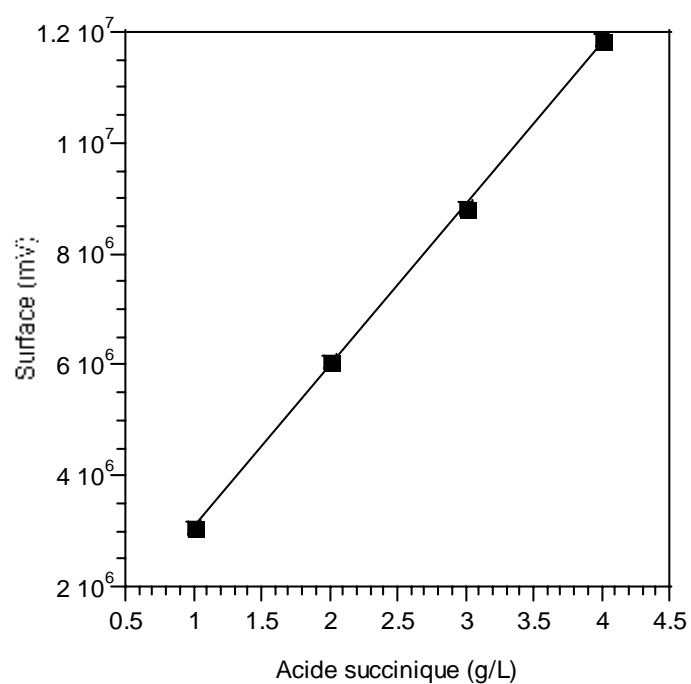


Fig. 10. Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide succinique par HPLC

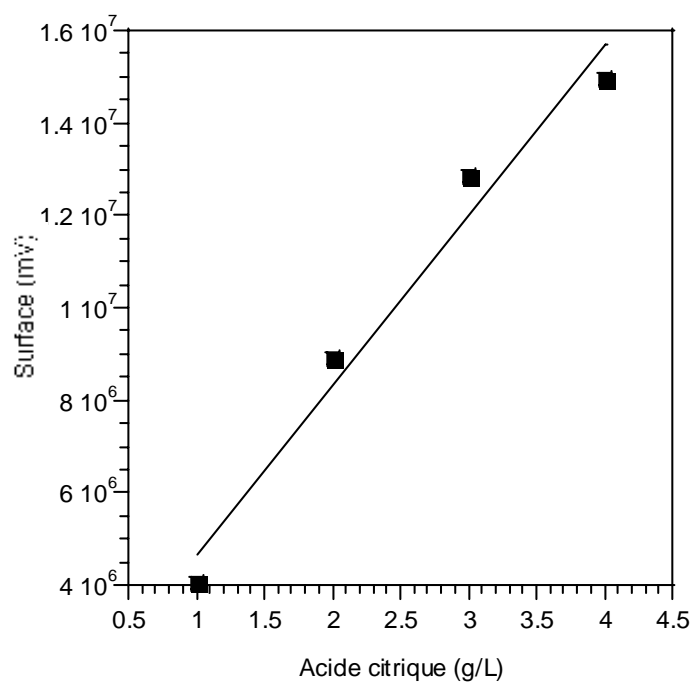


Fig. 11. Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide citrique acétique par HPLC

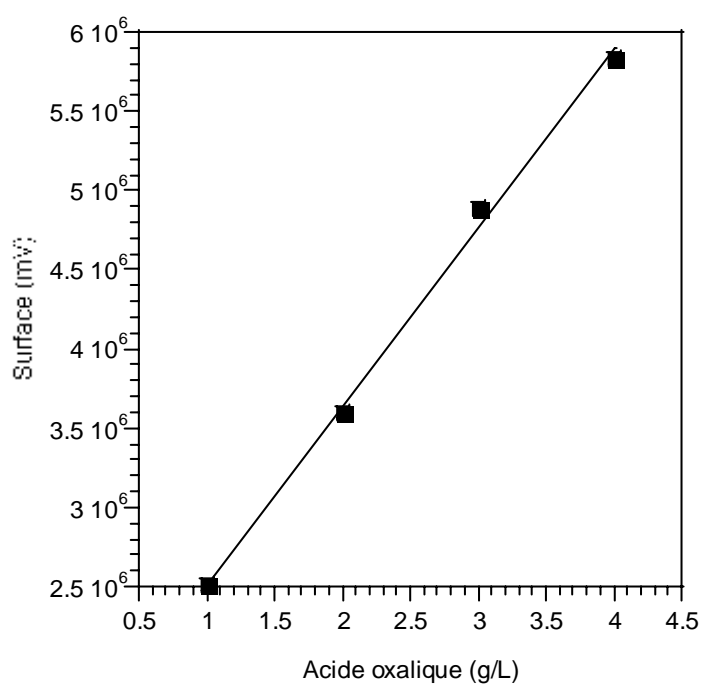


Fig. 12. Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide oxalique par HPLC

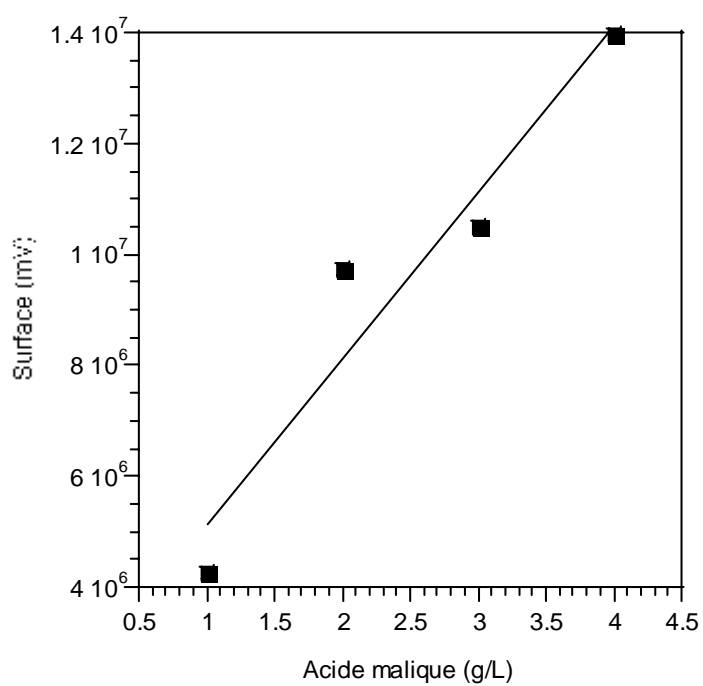


Fig. 13. Courbe d'étalonnage pour le dosage d'acide malique par HPLC

VII. Purification des métabolites

VII.1. Extraction par des solvants

Après 13 jours de fermentation en présence du mutant *A. ochraceus* M18, le milieu est filtré sur 0,45 µm Millipore de cellulose. Dix ml de filtrat sont extraits, deux fois, avec 10 ml de chloroforme. Les 20 ml d'extrait de chloroforme sont ensuite concentrés à sec, puis récupérés dans 1 ml de méthanol. Enfin, l'échantillon est stocké à -20 °C en attendant de le faire analyser par HPLC.

VII.2. Utilisation de la chromatographie à couche mince (CCM)

Une chromatographie sur couche mince (CCM) a été utilisée pour une première séparation des métabolites. L'extrait brut a été dissous dans 1 mL de MeOH et puis 200 µL ont été appliqués sur des plaques (20 x 20 cm) de gel de silice GF 254 (Merck). La séparation a été réalisée en présence d'un mélange de toluène - acétate d'éthyle - 90 % acide formique (5: 4: 1, v/v/v). Les plaques sont par la suite séchées et examinées sous grande onde UV ($\lambda_{\text{max}} = 365$ nm), les bandes observées ont alors été raclées et récupérées séparément, par la suite du méthanol est utilisé pour récupérer les métabolites (10 métabolites) et injecté en HPLC préparatif pour une purification supplémentaire.

VII.3. Analyse en HPLC

L'appareil HPLC (High Performance Liquid Chromatography) permet une détection par fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 332$ nm; $\lambda_{\text{em}} = 466$ nm) et par UV (détecteur à barrette de diode). Le système est équipé également d'une pompe permettant d'obtenir des gradient et l'ensemble est piloté par un ordinateur. Un logiciel (Kroma 3000) permet de piloter l'ensemble du système et d'assurer l'acquisition des données. La colonne analytique utilisée était un 150 x 4,6 mm Uptisphere 5 µm C18 ODB avec une pré-colonne du garde de 10 x 4 mm. La phase mobile a consisté en un mélange acétonitrile/acide acétique (0,2 %) à un débit de 1 mL min⁻¹ et la température de la colonne était 30 °C. Les injections ont été effectuées avec un injecteur auto-sampler (BIO-TEK, Milan, Italie) et le volume d'injection était de 80 µl. Pour l'analyse ou la séparation des métabolites, le programme suivant a été utilisé.

| Solvant Temps (min) | A | B |
|------------------------|----|----|
| | | |
| 0 | 90 | 10 |
| 30 | 50 | 50 |
| 35 | 10 | 90 |
| 43 | 10 | 90 |
| 45 | 90 | 10 |

Pour la quantification des métabolites, des courbes d'étalonnage ont été réalisés à partir de métabolites purifiés. Il s'agit de la melleine (Fig.14), le 4-HO-melleine (Fig.15), l'asperlactone (Fig.16), l'isoasperlactone (Fig.17), l'acide pénicillique (Fig.18), le dihydroacide pénicillique (Fig.19), et les quatre nouveaux composés **1** (Fig.20), **2** (Fig.21), **3** (Fig.22) et **4** (Fig.23).

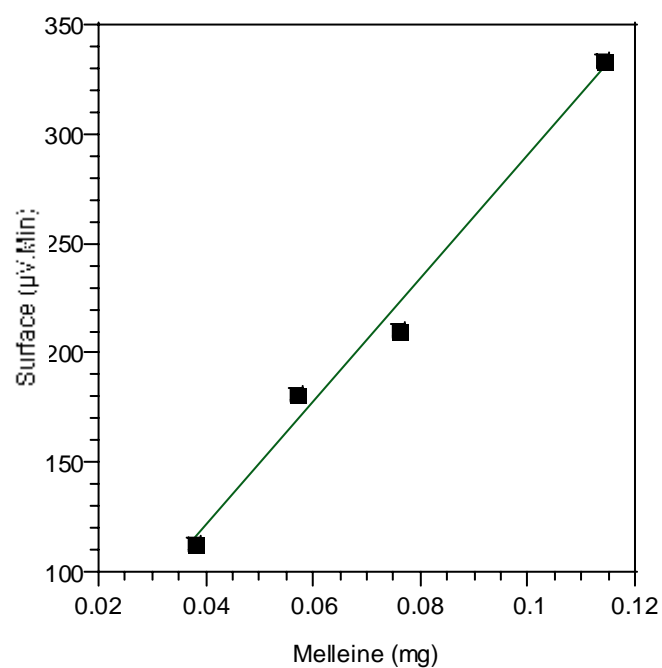


Fig. 14. Courbe d'étalonnage pour le dosage de la melleine par HPLC

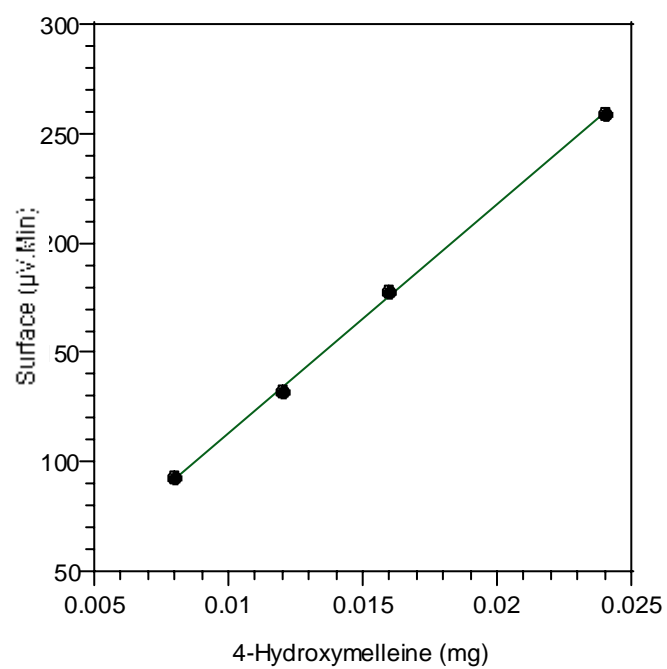


Fig. 15. Courbe d'étalonnage pour le dosage du 4-hydroxymelleine par HPLC

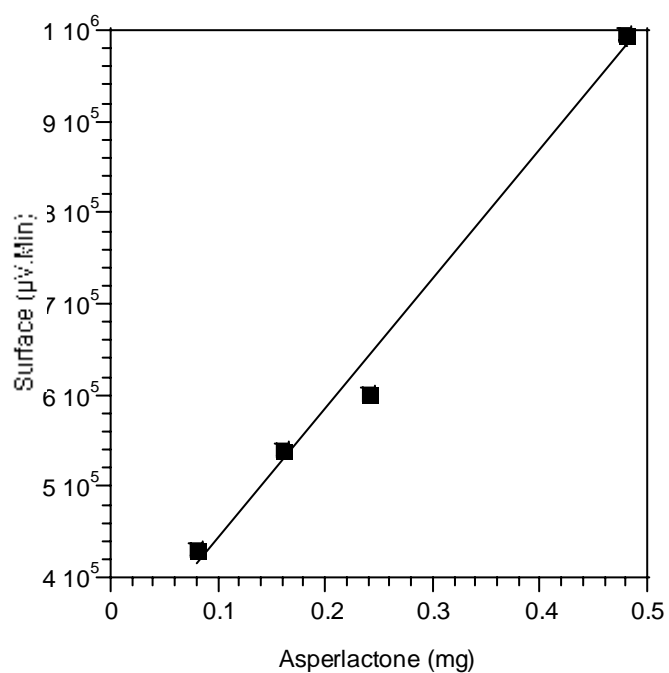


Fig. 16. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'asperlactone par HPLC

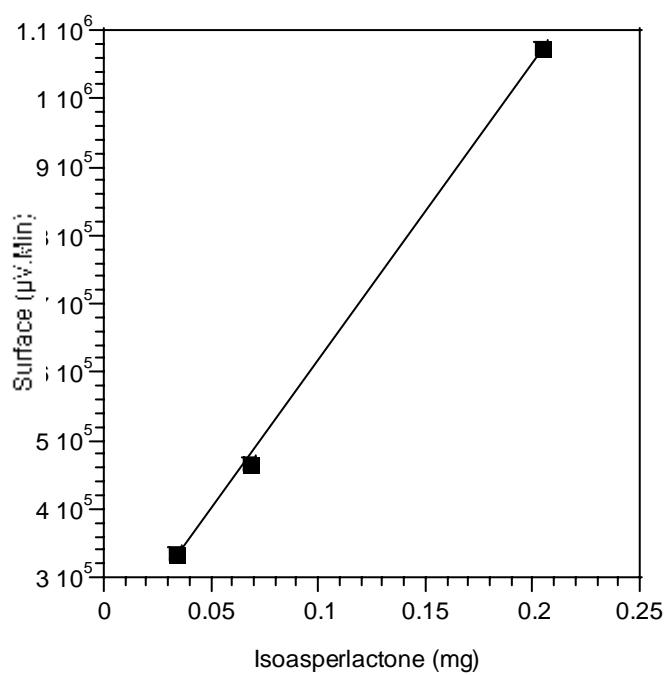


Fig. 17. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'isoasperlactone par HPLC

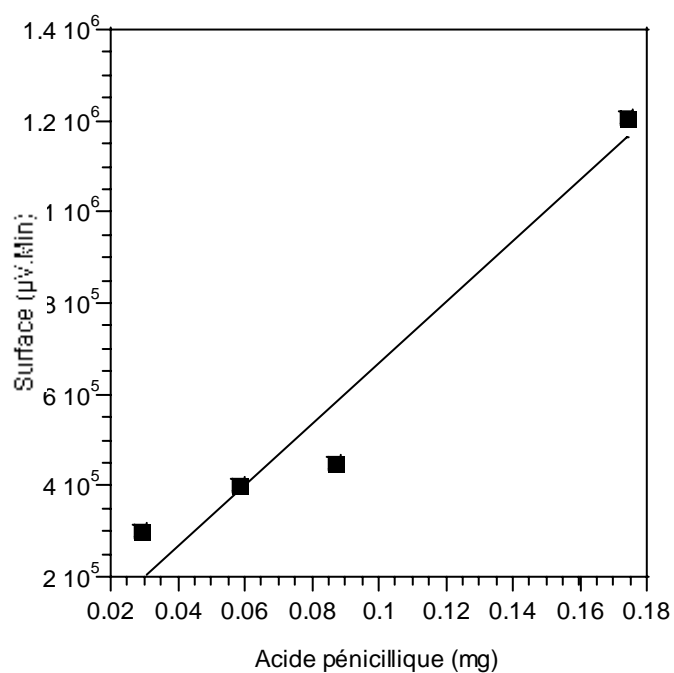


Fig. 18. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide pénicillique par HPLC

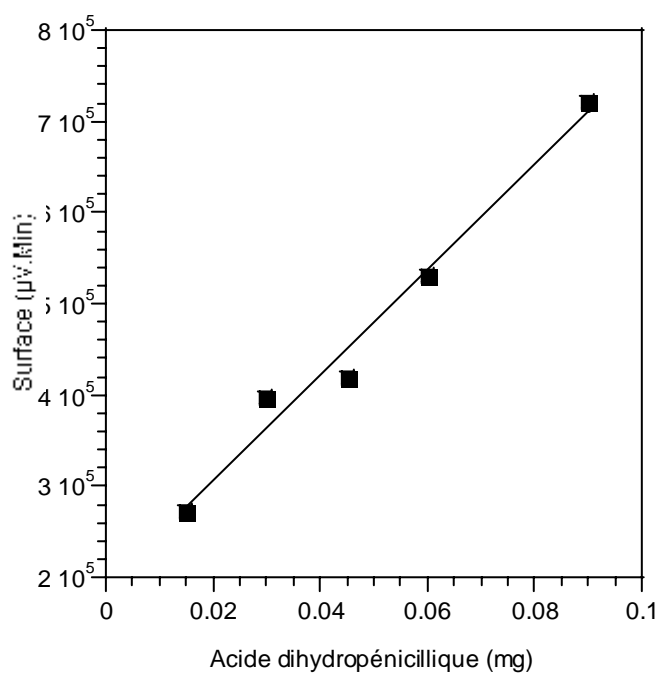


Fig. 19. Courbe d'étalonnage pour le dosage de l'acide dihydropénicillique par HPLC

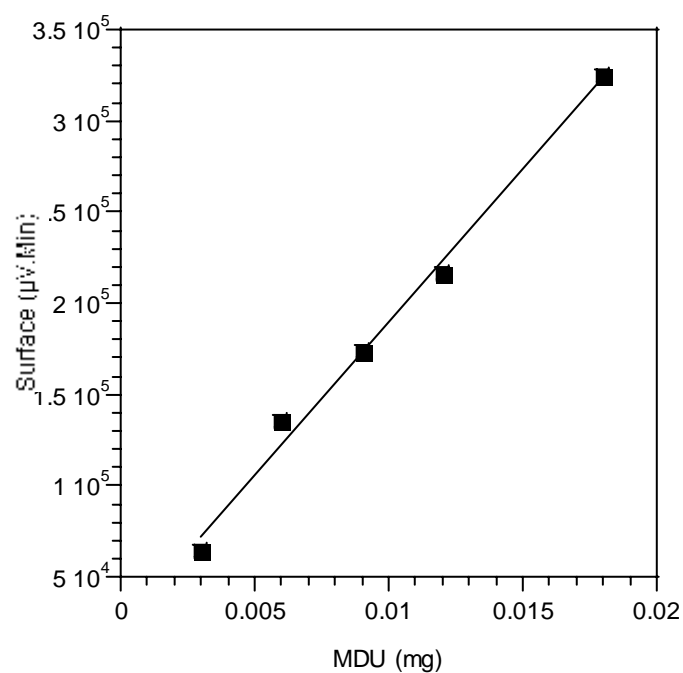


Fig. 20. Courbe d'étalonnage pour le dosage du composé MDU (composé 1) par HPLC

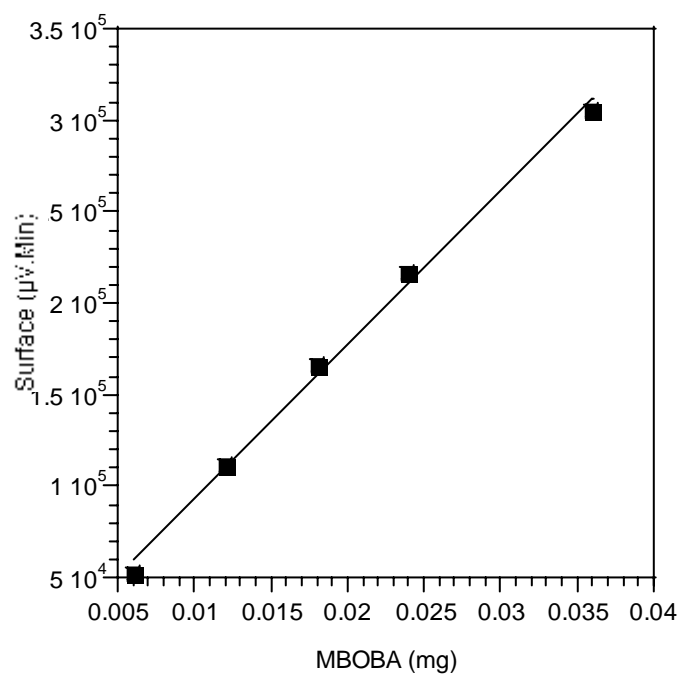


Fig. 21. Courbe d'étalonnage pour le dosage du MBOBA (composé 2) par HPLC

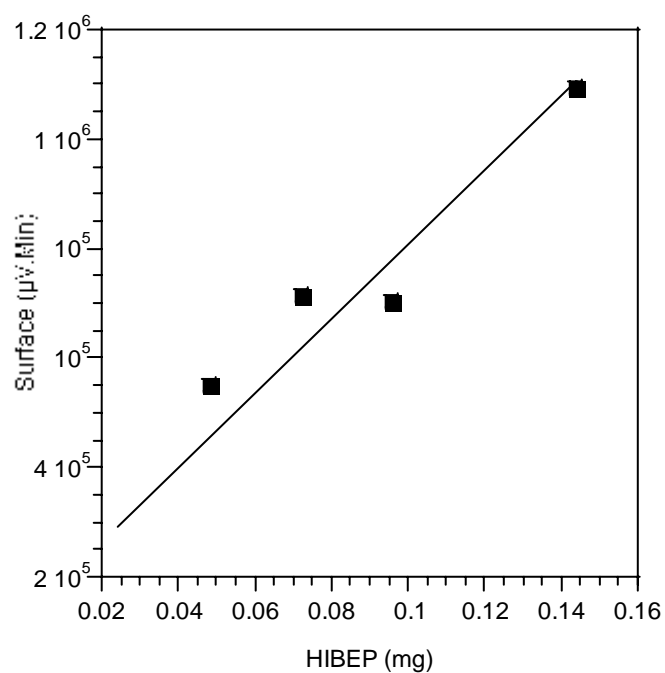


Fig. 22. Courbe d'étalonnage pour le dosage du HIBEP (composé 3) par HPLC

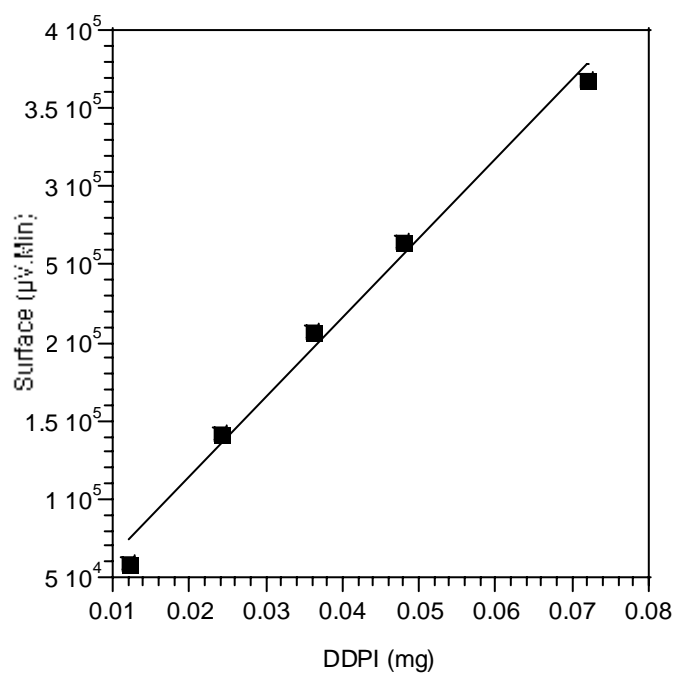


Fig. 23. Courbe d'étalonnage pour le dosage du DDPI (composé 4) par HPLC

VIII. Techniques spectroscopiques

VIII.1. UV, IR et la Masse

Les spectres UV-Visible ont été enregistrés sur un Beckman DU-65 spectrophotomètre, en utilisant le méthanol comme solvant. Les spectres infrarouges (IR) avec un Bruker IFS48 et les spectres de masse ont été effectuées sur Finnigan LCQ spectromètre équipé avec une source d'ions de 'nano-ESI-MS' nano-electrospray avec un intervalle de scannage de 100 à 1000 m/z .

VIII.2. Spectroscopie de Résonance Magnétique Nucléaire (RMN)

Les spectroscopies RMN $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ ont été utilisées pour la caractérisation des composés. Tous les signaux RMN ^1H et ^{13}C ont été assignés dans la base des déplacements chimiques (δ), les constantes de couplages (J), les intensités du signal et les expériences par cosy ^1H - ^1H , HMQC ^1H - ^{13}C et HMBC ^1H - ^{13}C . Les spectres RMN ont été enregistrés avec un spectromètre Bruker AMX 400, avec les signaux solvants comme références ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$: DMSO 2,50/40,36) ou ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$: CDCl_3 7,28 /77,45) à 400 MHz (^1H) et 100 MHz (^{13}C).

RMN Monodimensionnelle (1D)

RMN ^1H : les informations sont apportées, non seulement, par les déplacements chimiques (δ) mais aussi par la multiplicité des signaux et les constantes de couplages (J) en Hz.

RMN ^{13}C (J Mod) (J-Modulation) : On détecte les carbones présents dans la molécule par leurs déplacements chimiques, et on différencie leur taux de substitution par le signe du signal (primaires et tertiaires, pics négatifs ; et secondaires et quaternaires : pics positifs), grâce aux spectres totalement découplés.

RMN Bidimensionnelle (2D)

En ce qui concerne la RMN 2D nous pouvons observer :

Des corrélations homonucléaires ^1H - ^1H

- L'expérience **COSY** (COrelated SpectroscopY), homonucléaire ^1H - ^1H est plus simple et la plus utilisée. Les spectres mettent en évidence le couplage scalaire entre

deux protons d'un même système de spin et permettent donc de retrouver l'enchaînement des protons sur le squelette de la molécule.

Des corrélations hétéronucléaires ^1H - ^{13}C

Tous les spectres bidimensionnels hétéronucléaires sont enregistrés en mode inverse tels que :

- **HMQC** (Heteronuclear Multiple Quantum Coherence) : cette expérience permet d'observer le couplage direct ^1J entre le proton et le carbone ^{13}C qui le porte.
- **HMBC** (Heteronuclear Multiple-Bond Connectivity) : cette expérience met en évidence les couplages à longue distance ^1H - ^{13}C (^2J , ^3J , parfois jusqu'à ^4J).

IX. Les Activités Biologiques

IX.1. Test de l'activité biologique

L'activité biologique a été testée contre les bactéries, les moisissures et les levures.

- 24 μl de la suspension des micro-organismes cible (10^7 cellules/mL) sont ajoutés dans 100 mL de milieu ISP2 en fusion (environ 45 °C). Après agitation, le milieu est distribué dans des boîte de Pétri (90 mm de diamètre) à raison de 20 mL.
- Prélever dans la boîte de Pétri, à l'aide d'un emporte-pièce ($\Phi = 9$ mm), un nombre de carottes de milieu, selon le nombre de métabolites testés.
- Les métabolites sont déposés dans les puits correspondants et les boîtes déposées à 4 °C pendant au moins 4 h afin de permettre une meilleure diffusion des molécules.
- Les boîtes sont, par la suite, incubées à température de croissance de chaque microorganisme cible. Les diamètres d'inhibition sont mesurés après 24 à 48 heures.

IX.2. Les concentrations inhibitrices minimales (CIMs)

Le milieu gélosé contenant les microorganismes cibles est préparé de la même manière que précédemment. Cette fois-ci les puits seront remplacés par des disques en papier (5 mm de diamètre). Des quantités variables d'asperlactone et d'isoasperlactone (concentrations: 20; 50; 100; 200 et 300 $\mu\text{g/mL}$ méthanol - eau, 3: 7, v/v) et stérilisé sous UV rayons ($\lambda = 254$ nm)

pendant 15-20 min. Les disques sont par la suite placés sur le milieu indiqué. Le temps d'incubation était de 24 h, à 30 °C, pour tous les micro-organismes testés, à l'exception de *Lactobacillus bulgaricus* (37 °C). Les disques contenant seulement du méthanol- eau (3: 7, v/v), ont été utilisés comme témoin. Les micro-organismes testés étaient du *Micrococcus luteus* (*M.luteus*), de *Bacillus subtilis* (*B. subtilis*), du *Staphylococcus aureus* (*S. aureus*), du *Klebsiella pneumoniae* (*Klebs.pn*), du *Mucor ramannianus* (*Mucor.r*), du *Pseudomonas fluorescens* (*Ps.flu*) du *Lactobacillus casei* (*Lb.casei*) du (*Escherichia Coli*) *E. Coli*, du *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulg*) et du *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Après l'incubation, les diamètres d'inhibition sont mesurés. Les tests ont été réalisés trois fois et la valeur moyenne de chaque inhibition est calculée.

RESULTATS ET DISCUSSION

Chapitre I

**Sélection de mutants non producteur d'ochratoxine A et
détermination de la structure et étude de la production de
nouveaux métabolites secondaires chez *Aspergillus
ochraceus***

I. INTRODUCTION

Les champignons ont la capacité de produire une gamme importante des métabolites secondaires dérivant d'un enchaînement de poly - β - ketomethylene tel que les mycotoxines et les antibiotiques (O'Hagan, 1995). Les Aspergilli, tels qu'*Aspergillus niger*, *A. carbonarius* et *A. ochraceus* sont des espèces qui produisent d'importantes quantités d'ochratoxine A (OTA) de même que d'autres métabolites secondaires comme la melleine, l'orthosporine, la diaporthine et l'asperlactone (Larsen *et al.*, 2001). Plusieurs mycotoxines sont connues pour être produites par des espèces d'*Aspergillus* et de *Penicillium*, et plusieurs isolats ont été décrits comme toxigènes. Les mycotoxines sont des contaminants naturels dans différents types de nourriture animale et humaines. La contamination de la nourriture par ces mycotoxines peut générer de graves problèmes pour la santé humaine et animale ainsi que des pertes économiques (Aziz et Moussa, 2002). Beaucoup de mycotoxines possèdent une toxicité aiguë et chronique en concentrations basses, et certains sont de plus mutagènes, cancérigènes ou tératogéniques vis-à-vis d'une grande gamme d'organismes et cause des cancers même chez homme (Gennari *et al.*, 2004).

Ces 50 dernières années les recherches se sont orientées vers l'identification de nouvelles structures pour développer de nouveaux agents thérapeutiques en favorisant la détection, l'isolement et la caractérisation des métabolites secondaires de microorganismes. Nombreux sont les chercheurs qui, actuellement, s'engagent dans ces trois approches pour la découverte de nouveaux produits naturels, en explorant des micro-organismes, des plantes et des organismes marins (Marron, 1995).

Les champignons sont une source riche de molécules chimiques, et avec les actinomycètes ils sont la source de plus de 50 % des métabolites secondaires utilisés en industrie pharmaceutique sous forme native ou comme dérivés (Nielsen et Smedsgaard, 2003). Plusieurs métabolites secondaires ont été isolés du mycélium de *Penicillium citreo-viride*. Particulièrement, le citréo-viridin et ces pyrones apparentés produits par le *P. citreo-viride* (Kosemura, 2003). Les méroterpénoides sont des métabolites fongiques, bio-synthétisés à partir de terpènes et de polykétides qui ont été isolés chez *Aspergillus fumigatus* (Shiomi *et al.*, 1999). Les micro-organismes marins sont connus pour leur production de métabolites secondaires biologiquement actifs (Höller *et al.*, 1999).

La mutagenèse ou la biosynthèse combinatoire offrent des possibilités de modification des voies de biosynthèse aboutissant à la production de nouvelles molécules (Reynolds, 1998). Il est également connu que la composition de milieu de la culture peut avoir un impact important sur la production de produits microbiens. En général, la variation des paramètres de culture pour induire la

production des composés inconnus, reste aléatoire pour obtenir la production maximale de ces composés (Waites *et al.*, 2001). Les champignons exigent des sources d'azote inorganiques ou organiques comme éléments nutritifs pour réguler les métabolites secondaires. L'ion ammonium peut être utilisé comme source directe d'azote, alors que les autres formes d'azotes inorganiques sont transformées en ammonium avant leur utilisation (Moore, 1996). La production de certains métabolites secondaires dépend de la nature et des concentrations des sources de carbone et d'azote dans le milieu de culture.

Le but de cette étude est l'obtention de mutant non producteur d'ochratoxine A et induisant la production de nouveaux métabolites, la purification et la caractérisation de quatre nouveaux métabolites secondaires produits par le mutant *A. ochraceus* M18, ainsi que l'étude de l'effet de certaines sources de carbone et d'azote sur la production de ces quatre composés.

II. Isolement de mutants non producteurs d'ochratoxine A (OTA⁻)

Parmi les mutants isolés OTA⁻ (Tableau 3), certains (M2 et M12) ont perdu à la fois leur capacité à produire tous les métabolites secondaires étudiés ainsi que leur pigmentation. À l'exception de M2 et M12, les autres mutants ont gardé leur capacité à produire la melleine. Les mutants M1, M4 et M13 sont incapables de produire l'hydroxymelleine, ce pendant, M1 et M13 n'ont pas perdus totalement leur capacité à produire l'OTA. Le niveau de production reste très faible comparé à celui de la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

A. ochraceus NRRL 3174 produit de l'isoasperlactone (ISO), de l'asperlactone (AS) et de l'acide pénicillique (PA). Parmi les mutants obtenus, certains ne produisent aucun des ces composés et d'autres n'en produisent qu'un ou deux. Par exemple, les mutants M5, M10 et M17 sont PA⁻, ISO⁺, AS⁺, le mutant M7 est PA⁺, ISO⁻, AS⁺, les mutants M9, M13, M15, et M16 sont PA⁻, ISO⁻, AS⁺ et le mutant M4 est PA⁻, ISO⁻, AS⁻.

Parmi tous les mutants obtenus, certains accumulent de nouveaux métabolites. C'est le cas du mutant *A. ochraceus* M16 qui accumule deux nouveaux métabolites ayant des temps de rétention (TR) de 16,5 et 18 min. Le spectre UV/vis de ces deux métabolites est de $\lambda_{\text{max}} = 254, 262 \text{ et } 273 \text{ nm}$. Les mutants M3, M4, M5, M11, M14 et M16 ont également produit un nouveau composé ayant un temps de rétention de 21 min. Le mutant *A. ochraceus* M18 est le plus productif grâce à sa capacité d'excréter de nouveaux produits (8 nouveaux métabolites). Ce mutant a été utilisé pour la purification et la caractérisation de plusieurs nouveaux métabolites.

Tableau 3. Comparaison entre les chromatogrammes de la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (AO) et les mutants étudiés.

| TR (min) | Nom | AO | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 | M18 |
|----------|---------|------|------|----|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| 3,6 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 4,4 | | - | *** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 6 | ISO | **** | * | | **** | | **** | **** | | **** | | **** | | | | **** | | | **** | **** |
| 8 | AS | **** | ** | | **** | | **** | **** | **** | **** | ** | **** | | | **** | **** | **** | **** | **** | **** |
| 11 | PA | **** | **** | | **** | | | * | **** | * | | | **** | | | **** | | | | **** |
| 13 | | ** | - | | ** | * | | ** | ** | ** | | ** | | | ** | | | | | |
| 13,5 | Me-like | ** | | | ** | ** | | ** | | ** | | ** | | | ** | | | | ** | **** |
| 15 | | ** | ** | | ** | ** | ** | ** | | ** | | ** | ** | | ** | ** | **** | **** | **** | **** |
| 15,5 | HM | **** | | | **** | | *** | **** | *** | **** | **** | **** | * | | **** | *** | **** | **** | **** | **** |
| 16 | | *** | | | *** | | *** | *** | *** | *** | | **** | | | *** | | **** | **** | **** | * |
| 16,5 | TRI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** | - | * |
| 18 | TRI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** | - | - |
| 20,5 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** |
| 21 | | - | - | - | ** | **** | *** | - | - | - | - | - | ** | - | - | ** | - | ** | - | - |
| 21,5 | | *** | *** | | *** | *** | *** | *** | *** | *** | | *** | *** | | *** | *** | *** | *** | *** | ** |
| 24 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 25,2 | | - | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 26,5 | Me | **** | **** | | **** | **** | **** | ***** | **** | **** | **** | **** | **** | * | **** | **** | *** | *** | **** | **** |
| 28 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** |
| 29 | | - | *** | - | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 31 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** |
| 32 | | - | ** | - | - | ** | - | ** | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 | OTA | **** | ** | | | | | | | | | | | | ** | | | | * | |
| 37 | | - | - | - | - | *** | - | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

AO = *Aspergillus ochraceus*, M_n = Mutants, TR= Temps de Rétention, OTA = Ochratoxine A, ISO = Isoasperlactone, AS = Asperlactone, PA = Pénicillique acide, Me = Melleine, Me-lik = Mellein like, HM = Hydroxymelleine et TRI = Triène. / Métabolite production: **** Forte, *** Moyenne, ** Faible, * Très faible, - Nul /

■ Nouveaux métabolites,

□ Absence dans les mutants

III. Séparation et purification des nouveaux métabolites

Pendant notre étude, quatre nouveaux métabolites (Temps de rétentions de 24; 26,64; 27,39 et de 31 min) (Fig. 24) ont été isolés et purifiés à partir du mutant *A. ochraceus* M18. L'application de l'extrait brut de ce mutant sur le gel de silice (CCM) a révélé 7 bandes fluorescentes principales qui ont des mobilités relatives (R_f) de 0,33, 0,44, 0,5, 0,55, 0,58, 0,63 et de 0,84. La purification supplémentaire de ces bandes a été effectuée en utilisant le CLHP préparatif. Les quatre nouveaux métabolites **1** & **2** et **3** & **4** ont été obtenus par suite de l'analyse des bandes de R_f 0,58 et 0,44, respectivement par CLHP.

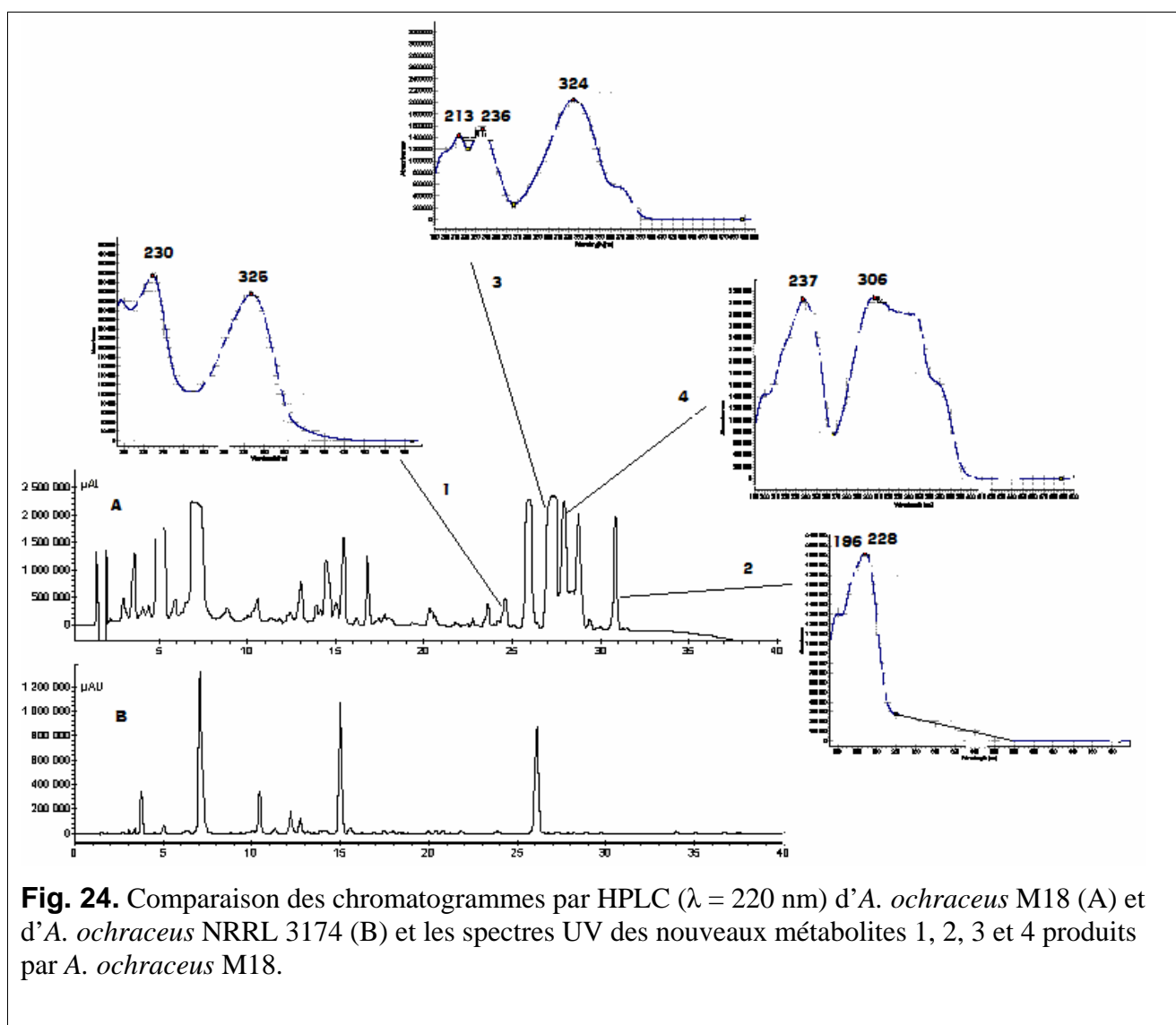


Fig. 24. Comparaison des chromatogrammes par HPLC ($\lambda = 220$ nm) d'*A. ochraceus* M18 (A) et d'*A. ochraceus* NRRL 3174 (B) et les spectres UV des nouveaux métabolites 1, 2, 3 et 4 produits par *A. ochraceus* M18.

IV. Données spectroscopiques et caractérisation de nouveaux métabolites

Les propriétés physicochimiques des deux nouveaux métabolites **1** et **2** sont résumées dans le tableau 4. La formule moléculaire de composé **1** a été établie comme étant $C_{13}H_{20}O_2$ par LC-MS (m/z 208) et par $^1H/^{13}C$ RMN. L'IR a montré des bandes d'absorption caractéristiques d'OH (large, 3500 cm^{-1}), d'alcène C-H (3066 cm^{-1}), d'aliphatique C-H (2956 et 2870 cm^{-1}) et de groupe carbonyle

(1644 cm^{-1}). Le spectre de ^{13}C RMN a engendré 13 signaux de carbone et a supporté la formule moléculaire. L'HMQC a indiqué 9 carbones portant des protons. Le spectre DEPT a suggéré la présence de 4 méthyles, 2 méthylènes et 3 carbones méthiniques. L'HMBC a révélé la présence de 4 carbones non - hydrogénés. Le spectre de ^{13}C RMN a indiqué la présence d'un groupe carbonyle cétonique conjugué (δ 157,4). L' ^1H RMN et le spectre COSY ont indiqué une liaison hydrogène à δ 11,98 (br.), un hydrogène aromatique, H-5 (δ 7,05), 2 hydrogènes aliphatiques, H-2 et H-10 (δ 1,92 et δ 2,10, respectivement), 4 hydrogènes aliphatiques, H-3 et H-9 (δ 2,26 et δ 2,47, respectivement) et 12 hydrogènes aliphatiques de 4 groupes méthyles, H-1 et H-11 (δ 0,85 et δ 0,87, respectivement).

Par ailleurs, une formule moléculaire de composé **2**, $\text{C}_{13}\text{H}_{16}\text{O}_3$, a été déduite de LC-MS (m/z 220) et de ^{13}C RMN. L'UV a montré des longueurs d'ondes d'absorption maximale à 196 nm et 228 nm. Le spectre IR du composé **2** a montré des bandes d'absorption à 2500 - 3600 cm^{-1} (br., OH carboxylique), 2963 et 2924 cm^{-1} (C - H aliphatique), 3050 cm^{-1} (C - H aromatique, alcène), 1712 cm^{-1} (C = O), 1250 cm^{-1} (C - O, dans l'éther de aryl allyl) et à 800 cm^{-1} (1,4 disubstitution). Le spectre de ^{13}C RMN a engendré 13 signaux de carbone: un carbonyle (δ 174,2), 3 carbones non - hydrogénés, 2 méthyle, 2 méthylène et 5 carbones méthinique. Le spectre de ^1H RMN a montré un singlet à δ 11,5 (br.) d'un hydroxyle de groupe carboxylique, 2 hydrogènes aromatiques, H - 2 et H - 6 (δ 7,12), 2 hydrogènes aromatiques, H - 3 et H - 5 (δ 6,81), 4 hydrogènes aliphatiques, H - 7 et H - 9 (δ 3,33 et δ 4,48 respectivement), un hydrogène alcénique, H - 10 (δ 5,42), 6 hydrogènes de deux groupes de méthyle, H - 12 et H - 13 (δ 1,74 et δ 1,70 respectivement). Les fragments structuels se sont assemblés par HMBC pour révéler la structure.

D'après les données spectroscopiques (Tableau 4), les structures des deux nouveaux composés **1** et **2** ont été établis comme étant 2, 10-diméthyl 4-hydroxy-6-oxo-4-undécen-7-yne (**1**) et 4-(3-méthyl-2- butenyl) oxy 1-phenyl acide acétique (**2**) respectivement (Fig. 25).

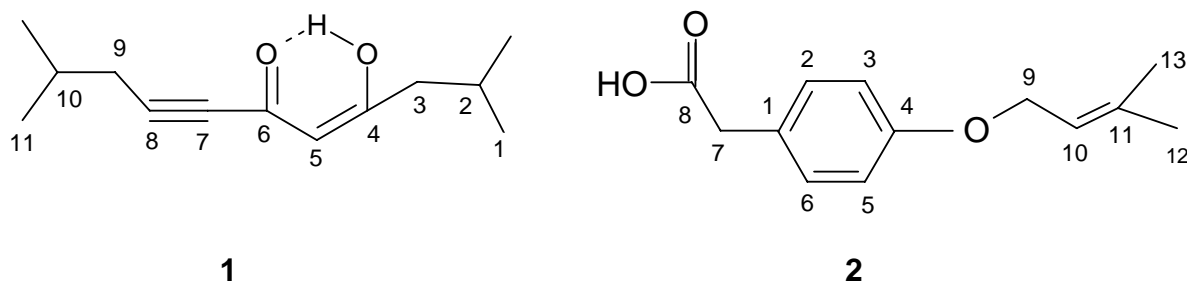
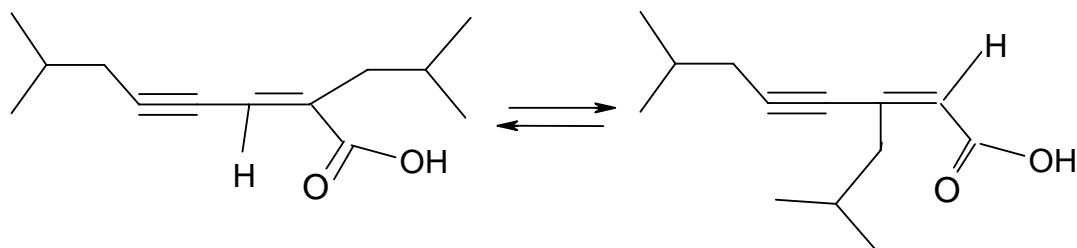


Fig. 25. Structures chimiques des composés **1** et **2**.

D'autre structure chimique proposée de composé **1** est comme suit :



Les propriétés physicochimiques d'autres nouveaux composés **3** et **4** sont résumées comme suit :

Le composé **3** se présente sous forme de poudre brune, $C_{13}H_{20}O_4$ MW 240; IR (KBr) 3437, 3114, 2959, 2929, 2870 (s), 2450, 2059, 1637 (C=O cétone ou carboxy conjugué), 1583 (C=C endocyclique), 1461, 1428, 1384, 1240, 1160, 1093, 1041, 900 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} nm 213, 236, 324; 1H RMN, ^{13}C RMN (voir le tableau 5); LC/MS-ESI: 239 (M-H) $^-$, M $^-$ (240) ($C_{13}H_{20}O_4$), 223 (239-O), 205 (239-O-H $_2$ O), 179 (239-O-H $_2$ O-C $_2$ H $_2$), 121 (239-O-H $_2$ O-C $_2$ H $_2$ -CO).

Le nouveau métabolite **4** est un composé huileux, $C_{25}H_{35}O_6$ MW 431; IR (KBr) 3317, 2960, 2927(s), 2873, 1725, 1644, 1576, 1547, 1531, 1464, 1382, 1223 cm^{-1} ; UV (MeOH) λ_{max} nm 237, 306; 1H RMN, ^{13}C RMN (voir le tableau 5); LC/MS-ESI: 432 (M+H) $^+$, M (431) ($C_{25}H_{35}O_6$), 413 (431- H $_2$ O), 386 (431- C $_2$ H $_5$ O), 230 (386- C $_{10}$ H $_{20}$ O), 179 (230-C $_4$ H $_3$).

Les données spectrales (UV, IR, MS, 1H RMN et ^{13}C RMN) ont permis de déduire que la formule moléculaire du nouveau métabolite **3** correspond à $C_{13}H_{20}O_4$ (m/z 240). La bande d'absorption IR à 3437 cm^{-1} indique la présence d'un groupe hydroxyle et les bandes à 2959, 2929 et 2870 cm^{-1} montrent la présence de C-H aliphatique, alors que, la bande à 3114 cm^{-1} indique la présence de C-H aromatique ou alcène. La présence d'un groupe carbonyle a été révélée par la bande à 1637 cm^{-1} . En outre, la présence de groupe époxyde a été prouvée par des bandes caractéristiques à ~ 1250 et ~ 900 cm^{-1} . Dans le spectre de 1H RMN de composé **3**, la présence de signaux typiques a été détectée à δ 0,99, 0,99 (chaque 3H, m), 0,95, 0,95 (chaque 3H, m), 2,16 (1H, d), 2,20 (1H, d), 2,62 (2H, t), 2,73 (2H, t), 7,29 (H- arom, s) et 2,07 (OH-4, s). Le spectre de ^{13}C RMN du composé **3** a révélé 13 carbones, l'expérience HMQC a indiqué que les carbones portant les protons sont au nombre de 9 et le spectre DEPT a suggéré la présence de quatre méthyles, deux méthylènes, trois méthines et quatre carbones quaternaires. Toutes ces données ont mené à la conclusion que la structure de composé **3** est 4-Hydroxy-5,6-diisobutyl-5,6-époxy-pyrone (Fig. 26).

Par ailleurs, les données spectrales (UV, IR, MS, ^1H RMN et ^{13}C RMN) ont permis de déduire que le métabolite **4** avait la formule moléculaire $\text{C}_{25}\text{H}_{35}\text{O}_6$. Ceci est confirmé par le spectre de masse qui a montré un ion moléculaire à m/z : 431. Le spectre IR de composé **4** a montré la présence de groupe hydroxyle à 3317 cm^{-1} et de C-H aliphatique à 2960 , 2927 et 2873 cm^{-1} ; de plus, la présence de groupe du carbonyle lactonique est confirmée par signal à 1644 cm^{-1} . ^1H RMN a indiqué la présence de signaux à δ 0,97 (3H, d), 0,98 (3H, d), 2,22 (1H, m), 2,69 (2H, q), 0,90 (3H, d), 0,95 (3H, d), 2,06 (1H, t), 2,36 & 2,54 (2H, q), 1,50 (3H, d), 4,31 (2H, d), 0,89 (3H, d), 1,17 (3H, d), 4,39 (3H, t), 4,31 (2H, t), 7,09 (1H, d), 7,02 (1H, s), 4,94 (1H, d), 6,49 (OH-6, s) et 2,07 (OH-15 & 18, s). Le ^{13}C RMN du composé **4** a révélé 25 carbones, l'expérience HMQC a montré que les carbones portant les protons étaient au nombre de 15 et le spectre DEPT a suggéré la présence de sept méthyles, deux méthylènes, huit méthines et huit carbones quaternaires. La structure de composé **4** déduite de ces analyses est 3,13-Dihydro-6-hydroxy-3,13-diethanolo-8,11-diisobutyl-7,12-pyrano-isocoumarine (Fig. 26).



Fig. 26. Les structures chimiques des composés **3** et **4**.

D'autre structure chimique proposée de composé **3** est comme suit :

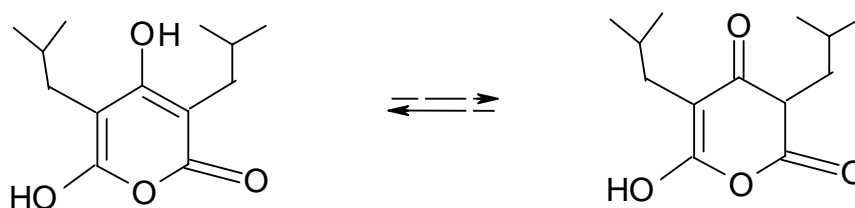


Tableau 4. Propriétés physicochimiques des deux nouveaux métabolites **1** et **2** produites par le mutant *A. ochraceus* M18.

| Propriétés | 1 | 2 |
|---|---|---|
| Apparence | Poudre brune | Poudre brune |
| Formule moléculaire | $C_{13}H_{20}O_2$ | $C_{13}H_{16}O_3$ |
| Poids moléculaire | 208 | 220 |
| MS (FAB, positive ions), m/z : | 207 (M-H) ⁺ , 164 (207– C_3H_7), 121 (207– 2 x C_3H_7) et 93 (207– 2 x C_3H_7 – CO). | 219 (M-H) ⁺ , 175 (219 – CO_2) et 106 (219 – CO_2 – C_5H_9). |
| UV [λ_{max} , nm (ϵ)] dans le méthanol | 230 (5531), 325 (4455) | 196 (13987), 228 (9926) |
| IR (KBr) | 3500 (OH, large), 3066 (C-H alcène), 2956 et 2870 (C-H aliphatique), 2200 (alkyne), 1644 (C=O), 1467, 1260, 1096, 1017 et 797 cm^{-1} . | 2500 - 3600 (Br. OH de COOH), 2963 et 2924 (CH aliphatique), 3050 (CH aromatique, alcène), 1712 (C=O), 1250 (C-O, dans les éthers d'aryl allyl), 800 (1,4 disubstitution) et 1000 – 1300 cm^{-1} (C-O). |
| ¹ H RMN, 400 MHz dans DMSO (δ , mult. J) | 0.85 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-1) ; 1.92 (1H, t-septuplet, J = 6.6, 7.3 Hz, H-2); 2.26 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-3); 7.05 (1H, s, H-5); 11.98 (1H, br s, OH); 0.87 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-11); 2.10 (1H, t-septuplet, J = 6.6, 7.1 Hz, H-10) et 2.47 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-9). | 7.12 (2H, m, AA'XX' System, JAX/A'X'= 8.7 Hz, JAA'/XX' = 2.5 Hz, H-2 et H-6); 6.81 (2H, m, AA'XX' system, JAX/A'X'= 8.7 Hz, JAA'/XX'= 2.5 Hz, H-3 et H-5); 3.33 (2H, s, H-7); 11.5 (1H, br s, OH); 4.48 (2H, d-septuplet, J= 6.6, 0.7 Hz, H-9); 5.42 (1H, t-septuplet, J= 6.6, 1.3 Hz, H-10); 1.74 (3H, d, J= 1.3, 0.7 Hz, H-12) et 1.70 (3H, d, J= 1.3, 0.7 Hz, H-13). |
| ¹³ C PMN, 100 MHz dans DMSO (δ) | 22.8 (C-1); 28.4 (C-2); 39.0 (C-3); 139.1 (C-4); 122.05 (C-5); 157.4 (C-6); 85 (C-7); 90 (C-8); 41.7 (C-9); 26.9 (C-10) et 23.4 (C-11). | 128.7 (C-1); 131.0 (C-2 et 6); 114.4 (C-3 et 5); 157.6 (C-4); 42.7 (C-7); 174.2 (C-8); 65.0 (C-9); 121.1 (C-10); 137.6 (C-11); 18.9 (C-12) et 26.3 (C-13). |

Tableau 5. Les données de ^1H RMN et ^{13}C RMN (δ en ppm, J en Hz) pour les métabolites **3** et **4** dans $\text{CDCl}_3\text{-}d_1$ à 400 MHz (^1H) et à 100 MHz (^{13}C).

| Position | 3 | | 4 | |
|----------|------------------|------------------|------------------|---------------------------|
| | δC | δH | δC | δH |
| 1 | - | - | 162,7 | - |
| 2 | 152,5 | - | - | - |
| 3 | 124,2 | 7,29 s (1,15) | 90,4 | 4,94 d (3,4) |
| 4 | 136,0 | - | 149,2 | 7,02 s (1,6) |
| 5 | 128 | - | 160,8 | - |
| 6 | 129 | - | 68,10 | - |
| 7 | 37,19 | 2,62 t (1,26) | 144 | - |
| 8 | 27,43 | 2,16 d | 128,3 | - |
| 9 | 22,97 | 0,95 m (6,45) | 123,4 | 7,09 d (2,76) |
| 10 | 22,97 | 0,95 m (7,11) | - | - |
| 11 | 42,28 | 2,73 t (1,57) | 139,4 | - |
| 12 | 26,97 | 2,20 d (0,50) | 160 | - |
| 13 | 22,80 | 0,99 m (6,00) | 79,34 | 4,31 t (2,76) |
| 14 | 22,80 | 0,99 m (6,74) | 154,4 | - |
| 15 | - | - | 68,9 | 4,39 t (1,72) |
| 16 | - | - | 19,9 | 1,17 d (5,95) |
| 17 | - | - | 22,59 | 0,89 d (6,52) |
| 18 | - | - | 69,1 | 4,31 d (2,76) |
| 19 | - | - | 18,4 | 1,50 d (4,39) |
| 20 | - | - | 37,8 | 2,36, 2,54 q (2,18, 3,74) |
| 21 | - | - | 27,8 | 2,06 t (2,80) |
| 22 | - | - | 23,07 | 0,95 d (11,54) |
| 23 | - | - | 22,30 | 0,90 d (6,90) |
| 24 | - | - | 42,60 | 2,69 q (9,79) |
| 25 | - | - | 27,20 | 2,22 m (4,19) |
| 26 | - | - | 22,96 | 0,98 d (8,69) |
| 27 | - | - | 23,00 | 0,97 d (11,89) |
| 4-OH | - | 2,07 s | - | - |
| 15,18-OH | - | - | - | 2,07 s |
| 6-OH | - | - | - | 6,49 s |

V. Les activités biologiques

L'activité biologique de composé **1** a été testée contre cinq bactéries Gram + (*M. luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. smegmatis* et *L. monocytogenes*), trois bactéries Gram - (*K. pneumoniae*, *P. syringae pathovar. syringae* et *A. tumefaciens*), un champignon filamentaire (*M. ramannianus*) et une levure (*S. cerevisiae*). Ce composé a un effet inhibiteur sur *B. subtilis* et *S. aureus* mais n'a pas d'effets sur les autres souches testées. Cependant, le composé **2** n'a pas montré d'effets sur toutes les souches testées. Des études supplémentaires sont nécessaires pour montrer si le composé **1** a une CIM (Concentration Inhibitrice Minimale) intéressante contre *S. aureus* comparé aux autres antibiotiques connus.

D'autre part, les deux nouveaux métabolites **3** et **4** ont également montré des activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries Gram +, *B. subtilis*. Mais aucun n'était actif contre les autres souches testées (*Micrococcus luteus*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium smegmatis*, *Listeria monocytogenes*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Mucor ramannianus* et *Saccharomyces cerevisiae*).

VI. Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique des quatre métabolites caractérisés

Dans le cadre de cette étude, différentes sources de carbone (glucose, fructose, galactose, glycérol, saccharose, maltose, amidon et dextrines) à une concentration de 50 g/l. Les cultures ont été suivies au cours du temps et les valeurs les plus importantes calculées (Tableau 6).

VI.1 Effet sur la croissance

Le glucose et le fructose permettent des taux de croissance presque identiques ($0,023 \text{ h}^{-1}$ et $0,021 \text{ h}^{-1}$ respectivement), alors que le galactose et le glycérol ont révélé des taux de croissance plus faibles ($0,010 \text{ h}^{-1}$ et $0,012 \text{ h}^{-1}$ respectivement). Seul le maltose permet une croissance plus élevée ($0,045 \text{ h}^{-1}$). Parmi les oses utilisés, seuls le fructose et le glucose permettent un bon rendement en biomasse (21,14 et 14,17 g/l, respectivement). Le galactose et le glycérol ne permettent pas l'obtention de beaucoup de biomasse (7,25 et 9,01 g/l, respectivement). On remarque dans ce cas que plus la vitesse de croissance est grande, plus le rendement en biomasse est important. Les disaccharides utilisés permettent l'obtention d'une quantité de biomasse importante ($\sim 16\text{-}17 \text{ g/l}$) et l'amidon (11,3 g/l) est meilleur source de carbone pour la croissance que les dextrines ($\sim 7 \text{ g/l}$).

VI.2. Effet sur la production des nouveaux composés 1 et 2

La production spécifique des composés 1 et 2 est régulée par les sources de carbone étudiées (Tableau 6). La valeur la plus basse était relevée en présence du glucose et du fructose ($135\text{-}150 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$) pour le composé 1 et en présence du fructose, du galactose et du glycérol ($0,30\text{-}0,51 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$) pour le composé 2. Les valeurs les plus élevées ont été obtenues lorsque le mutant a été cultivé en présence du galactose, des dextrines et du saccharose ($607\text{-}955 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$) pour le composé 1 et seulement en présence des dextrines ($6,2 \text{ mg g}^{-1}\text{PS}$) pour le composé 2. Les dextrines sont une meilleure source de carbone que l'amidon pour la production de ces deux métabolites.

Tableau 6. Effet de sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique des quatre nouveaux composés **1**, **2**, **3** et **4** chez *A. ochraceus* M18.

| Source de carbone | PS _{max} (g l ⁻¹) | μ _{max} (h ⁻¹) | Production spécifique (mg.g ⁻¹ PS) | | | |
|-------------------|---|--|--|----------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Glucose | 14,17 | 0,023 | 135,4 | 2,00 | 2,18 | 8,31 |
| Fructose | 21,14 | 0,021 | 149,6 | 0,54 | 2,32 | 6,54 |
| Galactose | 7,25 | 0,010 | 955,2 | 0,29 | 2,09 | 0,74 |
| Glycérol | 9,01 | 0,012 | 318,0 | 0,51 | 0 | 0 |
| Saccharose | 16,25 | 0,025 | 607,2 | 2,29 | 1,56 | 6,20 |
| Maltose | 17,79 | 0,045 | 232,4 | 1,49 | 1,86 | 9,32 |
| Amidon | 11,34 | 0,023 | 285,9 | 2,42 | 8,38 | 16,46 |
| Dextrine | 6,93 | 0,019 | 714,9 | 6,16 | 1,99 | 47,63 |

L'évolution cinétique de la production spécifique montre qu'en présence de dextrines ou de saccharose, le composé 1 est produit tôt (Fig. 27a). La production spécifique maximale est obtenue après cinq jours d'incubation. Après cette période, aucune production n'a été observée. En présence d'autres sources de carbone comme le galactose, la production est en retard (après sept jours) et elle a atteint son maximum après neuf jours de fermentation.

La production spécifique de composé 2 montre un comportement cinétique différent de celui de composé 1. Dans le cas des dextrines et du saccharose, la production commence pendant la phase stationnaire alors qu'en présence de galactose, elle commence pendant la phase de croissance et continue à augmenter tardivement (Fig. 27b).

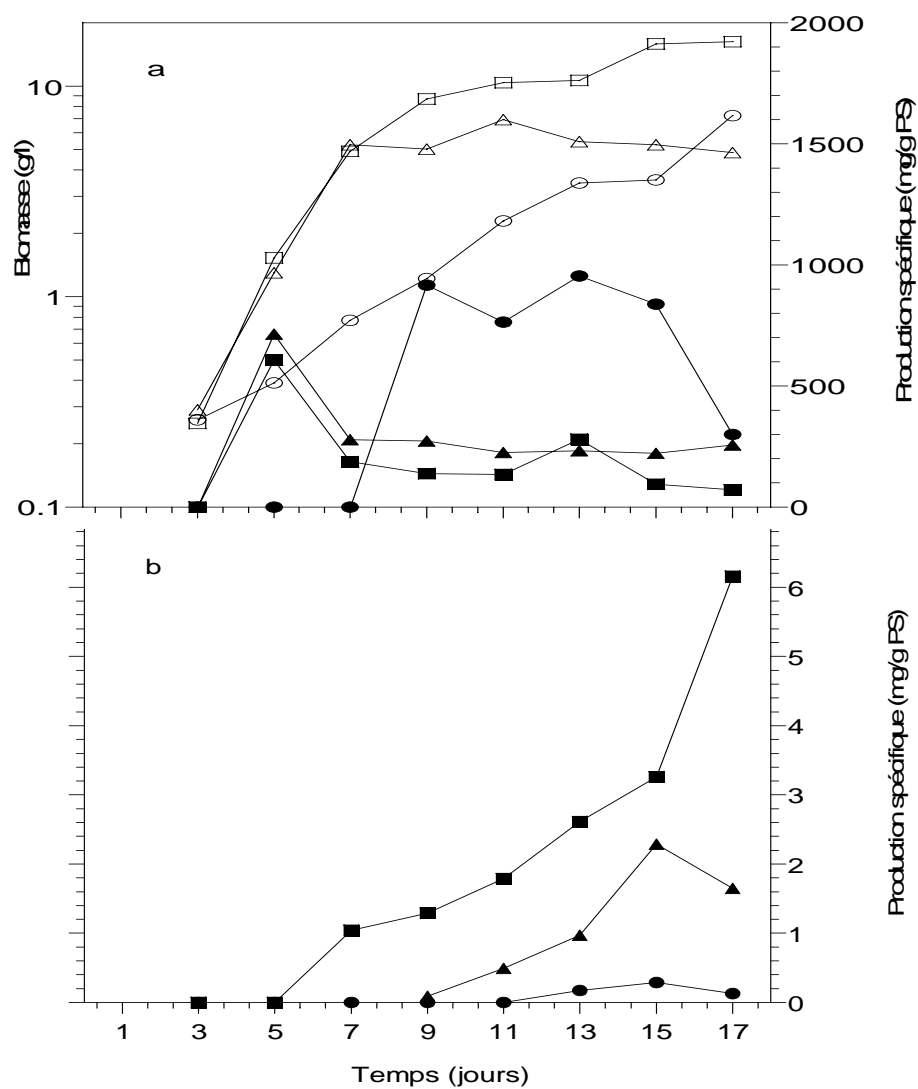


Fig. 27. Cinétique de croissance d'*A. ochraceus* M18 (symbole vide) et des productions spécifiques (symbole plein) des composés 1 (a) et 2 (b)) en présence de galactose(●,○), de dextrines (■,□) et de saccharose(▲,△).

VI.3. Effet sur la production spécifique des nouveaux composés 3 et 4

Dans le cas du composé 3, seul l'amidon permet une meilleure production (8,38 mg/g PS) (tableau 6). Les dextrines comme les autres sources de carbone permettent des productions spécifiques relativement comparables. Elles évoluent de 1,6 à 2,18 mg/g PS selon la source de carbone.

Alors que dans le cas du composé 4, la production spécifique est meilleure en présence de dextrines (47,6 mg/g PS) suivi par l'amidon (16,5 mg/g PS). À l'exception du galactose qui permet une très faible production (0,74 mg/g PS), toutes les autres sources de carbone permettent des productions relativement comparables (6,2 - 9,3 mg/g PS).

L'évolution cinétique du composé 3 (Fig. 28a) montre un démarrage au cours de la phase de croissance, à partir du 5^{ème} jour d'incubation avec les dextrines, et au 9^{ème} jour avec le glucose et l'amidon. Dans les autres sources de carbones, la production du composé 3 commence en retard (après 11 jours). La production du composé 3 atteint son maximum entre 11 et 13 jours de fermentation dans la plupart des sources du carbone excepté l'amidon, où la production augmente encore après 17 jours de fermentation.

La production spécifique du composé 4 (Fig. 28b) débute plus tôt (après 5 jours d'incubation) dans le cas des dextrines et après 9 jours de fermentation en présence des autres sources du carbone. Excepté en présence de fructose, la production continue à augmenter jusqu'à 17 jours d'incubation. Avec le glucose et le fructose, la production arrive à son maximum (8,31 mg/l PS et 6,54 mg/l PS, respectivement) aux 9 et 15 jours de fermentation respectivement. Nous avons observé que la production du composé 4 avec le galactose et le glycérol est très faible et nulle respectivement.

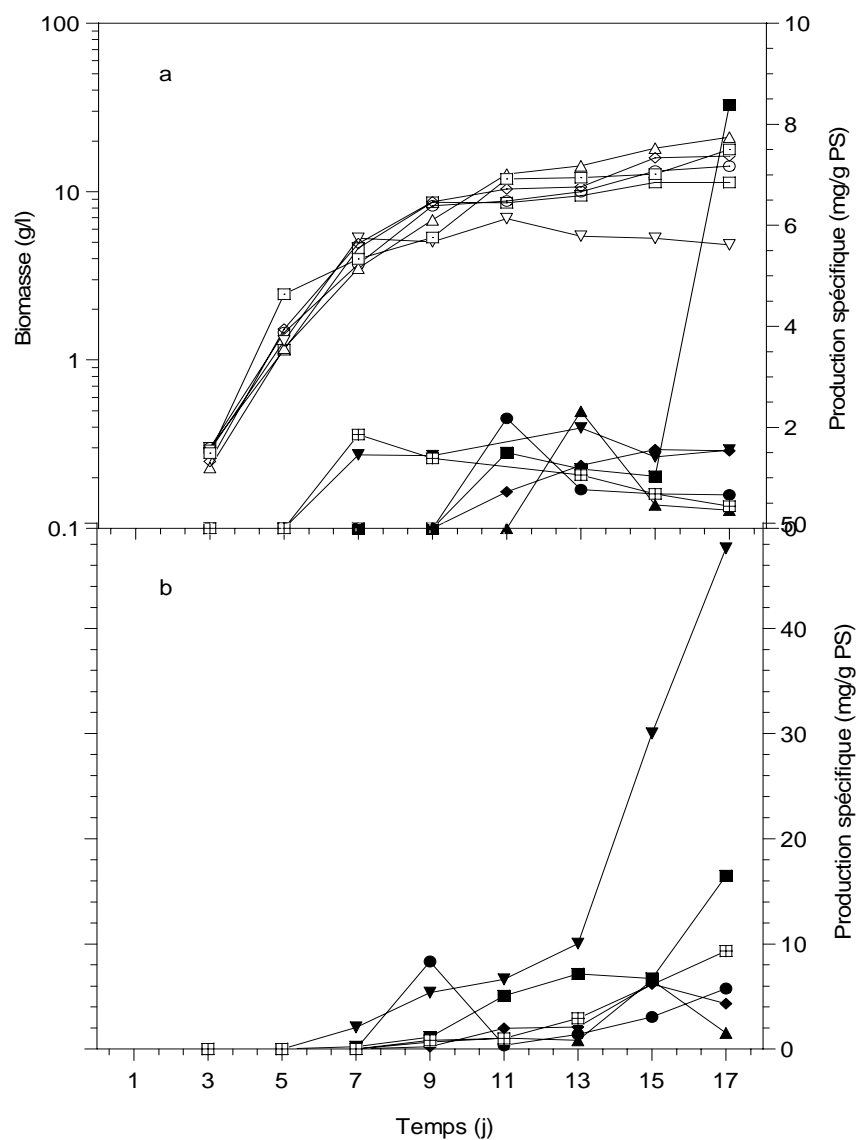


Fig. 28. Effet du glucose (●, ○), du fructose (▲, △), de l'amidon (■, □), des dextrans (▼, ▽), du saccharose (◆, ◇) et du maltose (⊞, ⊠) sur la biomasse (symbole vide) et sur la production spécifique (symbole plein) des composés 3 (a) et 4 (b) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu synthétique liquide qui contient NH_4NO_3 (3 g L^{-1}) comme unique source d'azote.

VII. Effet des différentes sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique des nouveaux métabolites

A. ochraceus M18 a été cultivé en présence de différentes sources d'azote [Acide glutamique, Méthionine, Phénylalanine, NH_4Cl , NH_4NO_3 et $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$]. Les cultures ont été servies au cours du temps et les valeurs maximales ont été résumées dans le tableau 7.

VII.1. Effet sur la croissance

Dans le cadre de cette expérience les acides aminés testés permettent une croissance plus faible ($0,01 - 0,014 \text{ h}^{-1}$) comparativement à celle obtenue en présence des sels d'ammonium ($\sim 0,032 \text{ h}^{-1}$). Le poids sec le plus élevé est de $30,2 \text{ g L}^{-1}$ obtenu en présence du $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, alors que, la phénylalanine et l'acide glutamique ne permettent qu'un faible poids sec; $4,34 \text{ g L}^{-1}$ et $6,20 \text{ g L}^{-1}$ respectivement.

Tableau 7. Effet des sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique de quatre nouveaux composés **1**, **2**, **3** et **4** chez *A. ochraceus* M18.

| N source | PS _{max} (g l ⁻¹) | μ _{max} (h ⁻¹) | Production spécifique (mg.g ⁻¹ PS) | | | |
|---|---|--|--|----------|----------|----------|
| | | | 1 | 2 | 3 | 4 |
| Acide glutamique | 6,20 | 0,011 | 769,4 | 4,14 | 41,33 | 14,48 |
| NH ₄ Cl | 8,94 | 0,032 | 281,3 | 0,43 | 3,53 | 2,45 |
| NH ₄ NO ₃ | 13,38 | 0,033 | 234,1 | 2,68 | 26,36 | 9,39 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 30,15 | 0,031 | 128,5 | 0,05 | 0,37 | 0,08 |
| Méthionine | 13,61 | 0,014 | 710,3 | 1,00 | 3,34 | 0,80 |
| Phénylalanine | 4,34 | 0,009 | 874,7 | 0,79 | 4,01 | 3,50 |

VII.2. Effet sur la production spécifique de nouveaux composés **1** et **2**

Les productions spécifiques des composés **1** et **2** sont influencées par les sources d'azote (tableau 7). La production la plus importante a été supportée en présence de phénylalanine, d'acide glutamique et de méthionine ($874,7$; $769,4$ et $710,3 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$, respectivement) pour le composé **1** et en présence d'acide glutamique ($4,14 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) et de NH_4NO_3 ($2,68 \text{ mg g}^{-1} \text{ PS}$) pour le composé **2**. Les autres sources d'azote n'ont permis que de faible production.

Les cinétiques des composés **1** et **2** étaient identiques à celles observées en présence de sources de carbone. La production spécifique du composé **1** a été associée à la croissance (Fig. 29a). La

production spécifique maximale a été obtenue après 5 à 7 jours d'incubation. En revanche, la production spécifique du composé 2 est dissociée de la croissance (Fig. 29b). Elle a commencé après 7 à 9 jours de fermentation et a été obtenue seulement après 13 à 15 jours d'incubation.

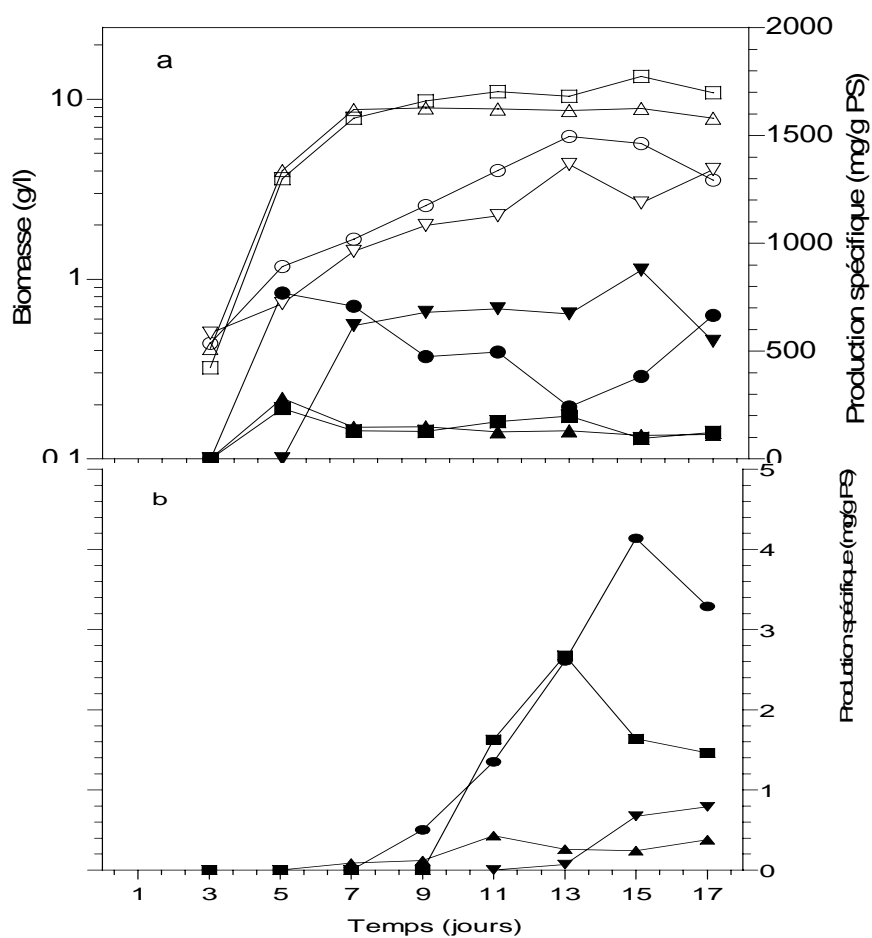


Fig. 29. Cinétique de croissance d'*A. ochraceus* M18 (symbole vide) et de productions spécifiques (symbole plein) des composés 1 (a) et 2 (b) en présence d'acide glutamique(●,○), de NH₄Cl(▲,△), de NH₄NO₃ (■,□) et de phénylalanine(▼,▽).

VII.3. Effet sur la production spécifique de nouveaux composés 3 et 4

Les productions spécifiques des composés 3 et 4 sont favorisées par l'acide glutamique et par la présence des ions nitrate. La méthionine, la phénylalanine ainsi que les autres sels d'ammonium ne permettent pas une bonne production de ces deux métabolites (tableau 7).

Le suivi de la production au cours du temps montre que ces deux métabolites se comportent comme la majorité des métabolites secondaires. En effet, leur production ne démarre qu'après 9 à 11 jours d'incubation. Cette production se poursuit d'une façon continue jusqu'à 15 à 17 jours d'incubation. La période de cette production coïncide avec un arrêt total de la croissance (Fig. 30).

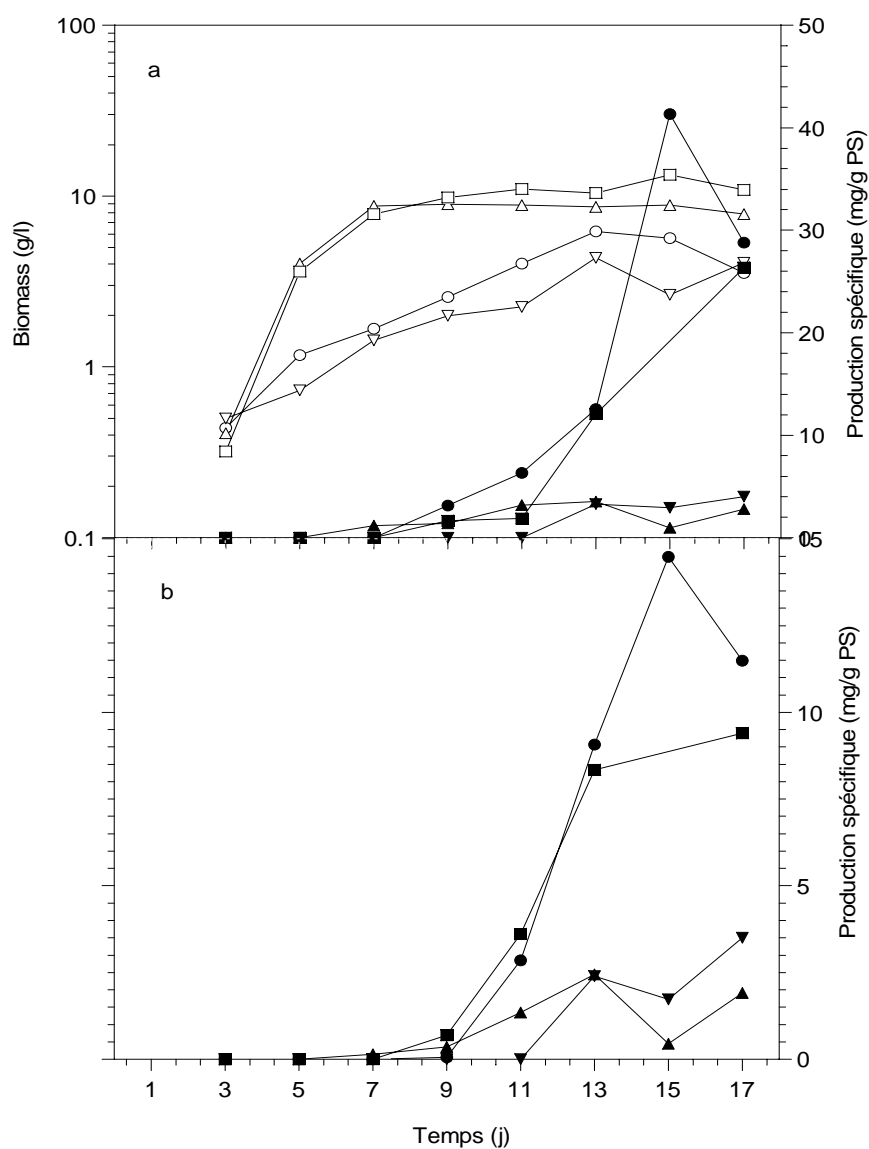


Fig. 30. Effet d'acide glutamique (●,○), du NH_4Cl (▲,△), du NH_4NO_3 (■,□) et de la phénylalanine (▼,▽) sur la biomasse (symbole vide) et sur la production spécifique (symbole plein) des composés 3 (a) et 4 (b) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu synthétique liquide contenant le glucose (50 g L^{-1}) comme unique source de carbone.

VIII. DISCUSSION

La mutation des spores fongiques est actuellement un point de la recherche intéressant. Des variants d'*Aspergillus* sp. et de *Penicillium* sp. peuvent être obtenues après une exposition aux UV. Ces variants peuvent être caractérisés par des changements dans la morphologie de la colonie, la dimension de la spore, le contenu de l'ADN et les produits formés (Agrawal *et al.*, 1999; Ruckmani *et al.*, 2002). La mutagenèse ou la biosynthèse combinatoire offrent une possibilité de produire de nouvelles activités enzymatiques qui résultent en des produits modifiés (Kennedy et Hutchinson, 1999). Différents auteurs ont obtenu, par exposition d'*Aspergillus* sp. aux UV, des nouveaux mutants différents de la souche sauvage, dans la couleur des conidies, les exigences du facteur de la croissance et l'activité de l'amylase (Sinha et Chakrabarty, 1978; Lee *et al.*, 2000). En théorie, chaque étape de biosynthèse peut être influencé au niveau de la traduction, de la transcription ou au niveau de l'activité enzymatique (Bode *et al.*, 2002). Ces phénomènes peuvent permettre la biosynthèse d'un nombre assez important de différentes molécules.

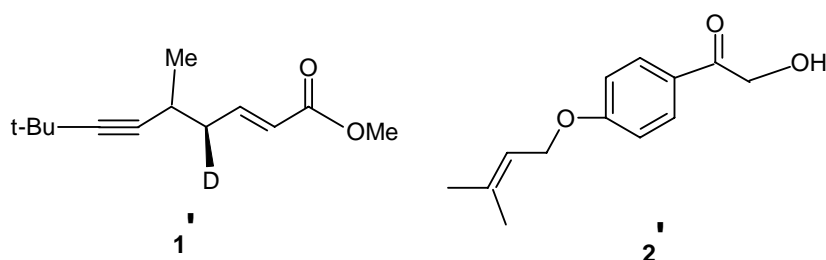
Dans le cas d'*A. ochraceus* NRRL 3174, une courte exposition aux UV a permis d'obtenir plusieurs variants intéressants. Ces variants, qui ont perdu la capacité de produire de l'OTA, de l'asperlactone, de l'isoasperlactone et/ou de l'acide pénicillique, peuvent servir à caractériser les intermédiaires accumulés et à aider aussi à bien comprendre la voie de biosynthèse de ces mycotoxines. Elles peuvent également servir à produire de nouvelles molécules d'intérêt industriel. C'est le cas du mutant *A. ochraceus* M6, par exemple, qui est OTA⁻ mais dont le rendement de melleine et d'hydroxymelleine a été multiplié par quatre. Ces deux composés sont des phytotoxines et peuvent être utilisés comme bio- herbicides (Parisi *et al.*, 1993). *A. ochraceus* M6 peut servir pour le développement de processus de production de ces deux bio-herbicides.

Les deux mutants (M2 et M12) ont perdu leur capacité à produire plusieurs métabolites secondaires ainsi que leur pigmentation. Ces mutants ont probablement subi une mutation dans des gènes contrôlant la différenciation physiologique. En effet, les voies biosynthétiques des métabolites secondaires peuvent être contrôlées par un gène spécifique ou par un gène contrôlant plusieurs voies en même temps. Ce phénomène est bien connu chez les micro-organismes filamenteux comme les actinomycètes et les champignons (Sprusansky *et al.*, 2003). Le mutant *A. ochraceus* M16 a accumulé des quantités importantes d'un nouveau métabolite, composé absent dans la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174. L'accumulation d'un produit triendiol par *A. ochraceus* DSM 7428 a été provoquée par le changement de la composition du milieu de culture (Bode *et al.*, 2002). Ces produits peuvent être de nouveaux métabolites ou des intermédiaires dans

la voie de biosynthèse d'ochratoxine A (ou d'autres métabolites secondaires) synthétisés par *A. ochraceus* en conditions différentes.

Tous les mutants OTA⁻ étaient capables de produire de la melleine. Si on considère la melleine comme une intermédiaire dans la biosynthèse d'OTA (Jonathan et Peter, 2001), les mutants obtenus sont affectés dans la voie qui mène à la transformation de la melleine en OTA. La perte de la capacité à produire de l'hydroxymelleine n'a pas affecté la capacité de la biosynthèse d'OTA. Cela confirme que l'hydroxymelleine et l'OTA peuvent être dérivés de la melleine. Dans le mutant *A. ochraceus* M18, la mutation a engendré une accumulation d'au moins huit métabolites. Ces métabolites résultent soit de l'expression de nouvelles voies biosynthétiques, soit des intermédiaires de la biosynthèse d'OTA et/ou de l'acide pénicillique. Parmi ces nouveaux métabolites, quatre composés 1, 2, 3 et 4 ont été identifiés et caractérisés.

Le composé 1 a le même poids moléculaire (m/z 208) et la même formule moléculaire ($C_{13}H_{20}O_2$) que le composé 1' (2-Nonen-6-ynoic-4-d acid, 5, 8, 8-triméthyle-, méthyle ester) mais leurs structures sont partiellement différentes. Le composé 1' a été chimiquement synthétisé par réaction 1, 3-butadiène et ses dérivés avec aliphatiques acétylènes terminaux (Mitsudo *et al.*, 1985).

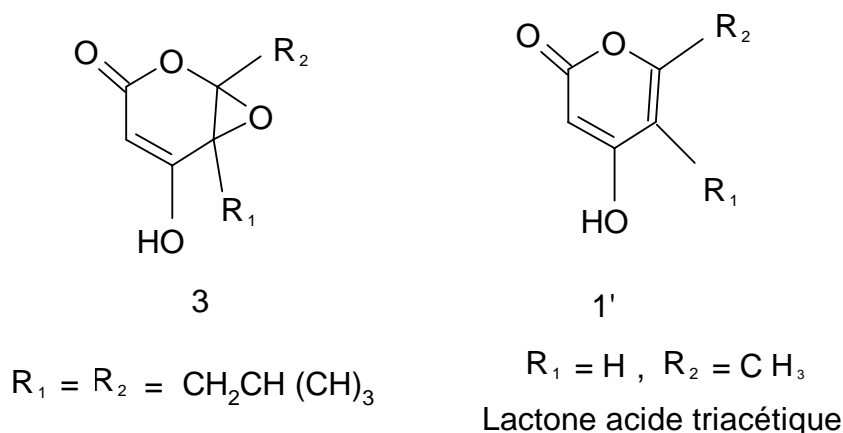


Le composé 2 a le même poids moléculaire (m/z 220) et la même formule moléculaire $C_{13}H_{16}O_3$ que le composé 2' (Ethanone, 2-hydroxy-1-[4-[(3-méthyl-2-butenyl) oxy] phényle]) et les deux structures coïncident complètement bien que le métabolite 2 soit un acide et le composé 2' un alcool primaire. Le composé 2' peut être converti en une diversité de composés benzyliques et allyliques et utilisé pour préparer le citaldoxime, un produit naturel antifongique (Kanno et Taylor, 2002). De plus, le composé 2 est dérivé du phényle d'acide acétique qui peut être utilisé comme précurseur pour produire les acides gras ω -cyclohéptyle. Ceci coïncide avec les propos de Moore *et al.* (1997) lesquels ont rapporté que l'origine de l'unité starter du cycloheptyl d'acide carboxylique des acides gras ω -cyclohéptyle, produit par *Alicyclobacillus cycloheptanicus* pourrait être dérivé

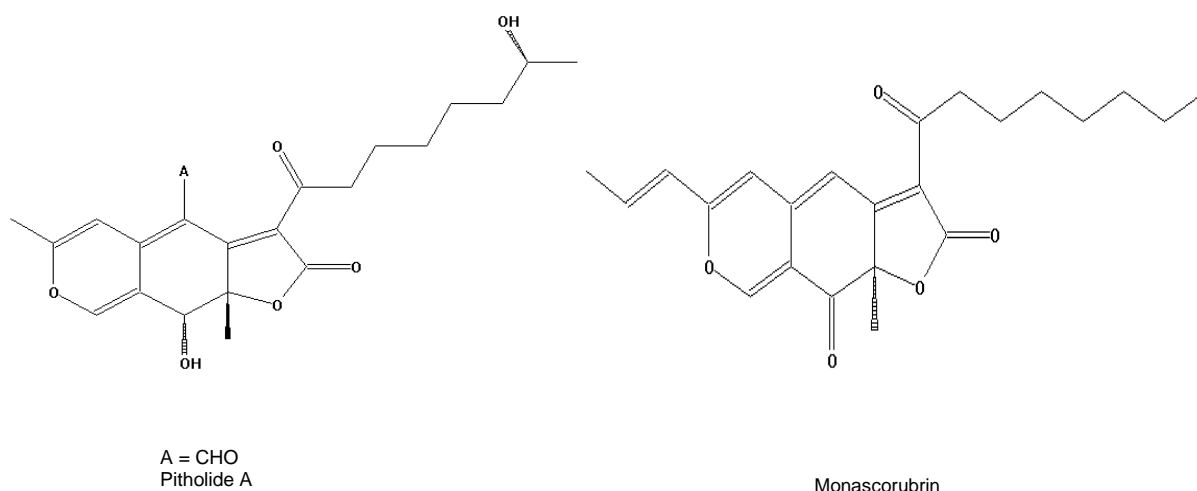
d'une voie de l'homo - shikimate en montrant que le phényle d'acide acétique pour être le précurseur. Le phényle acétique subit évidemment une expansion oxydative du cercle, suivie par une série de réductions pour donner le métabolite observé avant incorporation dans les acides gras.

Ces applications montrent que la production biologique du nouveau composé 2 pourrait être intéressante et économiquement viable. D'autres mutations et développement des procédés sont nécessaires pour augmenter le rendement de production de ce métabolite.

Le nouveau métabolite **3** a une structure semblable à celle de l'acide lactone triacétique (**1'**), dérivée des polykétides ou des hydrates de carbone et certains d'entre eux ont des origines biosynthétiques inconnues (Staunton, 1991). Les différences entre les deux structures résidaient en la présence de $R_1 = H$ et $R_2 = CH_3$ dans le composé **1'** alors que le contenu du nouveau métabolite **3** était $R_1 = R_2 = CH_2CH(CH_3)_2$. En outre, le composé **3** appartient au groupe époxyde contrairement au produit **1'**.



De la même manière, on peut constater une ressemblance dans les structures du composé 4 et le Pitholide A, Ce dernier a été isolé à partir de la culture d'un champignon marin isolé de l'eau salée, tout comme la monascorubrine qui a été obtenu à partir de la moisissure du *Monascus purpureus* (Wang *et al.*, 1997; Simpson *et al.*, 1997). Les deux structures étaient des polykétides terpéniques.



Les nouveaux composés **3** et **4** ont des activités antibactériennes ainsi qu'ils sont des polykétides comme les composés connus comparés. Ces peuvent être des intermédiaires dans la voie de biosynthèse d'ochratoxine A. Alors, des études supplémentaires sont nécessaires pour réaliser ce concept.

Les sources de carbone et d'azote étaient nécessaires à la croissance et à la formation du produit dans la culture microbienne. La nature et les caractéristiques de ces substrats ont un rôle prédominant dans le métabolisme des micro-organismes (Fraleigh *et al.*, 1989; Anderson et Jayaraman, 2003). Nombreux cas d'effet négatif du glucose sur le métabolisme secondaire ont été rapportés (Gallo et Katz, 1972; Hurley et Bialek, 1974; Telma *et al.*, 2003). Par exemple, le glucose s'est révélé affecter négativement la biosynthèse de pénicilline en réprimant des enzymes de la voie biosynthétique (Martin *et al.*, 1999). De plus, chez *Penicillium* sp., la production d'OTA a réprimé quand le glucose est ajouté au milieu de culture (Muhlencoert *et al.*, 2004). On rapporte également que le glucose inhibe la production des enzymes extracellulaires et la sporulation (Shafikhani *et al.*, 2003).

Dans *A. ochraceus* NRRL 3174, les cinétiques des composés **1** et **2** étaient différentes. Le composé **1** a été produit pendant la phase exponentielle alors que le composé **2** a été produit pendant la phase stationnaire. La majorité des métabolites secondaires ont le même cinétique que le composé **2**, cependant quelques uns d'entre eux ont été produits tôt pendant la phase exponentielle. C'est le cas de l'acide clavulanique produit par *Streptomyces clavuligerus* (Lebrihi *et al.*, 1987). Les études sur l'effet des sources de carbone ont indiqué que les productions des composés **1** et **2** ont été régulées par le catabolisme de carbone, comme c'est le cas avec beaucoup d'autres biosynthèses des

métabolites secondaires, tels que la cephamycine (Aharonowitz et Demain, 1978; Lebrihi *et al.*, 1988), la pénicilline et la céphalosporine (Martin *et al.*, 1999), l'acide Kojique (Rosfarizan et Ariff, 2000) et la lovastatine (Lai *et al.*, 2003). Par ailleurs, il n'est pas évident que les sources de carbone, qui permettent un taux spécifique de croissance faible, aient systématiquement et mutuellement donné une forte production spécifique car chaque source de carbone est un cas particulier.

Les métabolites **3** et **4**, comme d'autres métabolites secondaires, montrent que plusieurs modèles différents de croissance et de production dépendent du contenu nutritif du milieu de la culture. Nous avons trouvé que la production des nouveaux métabolites **3** et **4**, en présence de l'amidon et des dextrines comme uniques sources de carbone, est très élevée par rapport à d'autres sources du carbone étudiées; cela pourrait être dû à une hydrolyse lente et continue de l'amidon ou des dextrines fournissant des conditions renouvelables de source de carbone (Lam *et al.*, 1989). De plus, parmi plusieurs espèces des champignons testées, l'*Aspergillus* est le seul à produire de la α -amylase et de la glucoamylase dans un milieu synthétique liquide contenant de l'amidon comme unique source de carbone (Kvesitadze *et al.*, 1981). Par contre, la production des métabolites **3** et **4** a complètement inhibé si le glycérol est utilisé comme unique source de carbone. Ceci coïncide avec les résultats obtenus par Lebrihi *et al.* (1988) qui ont rapporté que le glycérol exerce son effet inhibiteur sur la croissance des cellules. À l'inverse de cet effet, la production d'OTA dans le *Penicillium* sp. a été induite lorsque le glycérol utilisé comme seul source de carbone (Muhlencoert *et al.*, 2004).

Les sources d'azote ont un rôle dominant dans la biosynthèse des métabolites secondaires. Parmi les sources d'azote minérales, l'ammonium est connu pour être un répresseur sur le métabolisme secondaire (Omura *et al.*, 1980a; Demain, 1991; Giordano *et al.*, 1999; Litzka *et al.*, 1999). La répression catabolite par les ions ammonium peut réguler les métabolites secondaires en inhibant et/ou en réprimant des enzymes qui permettent la biosynthèse des précurseurs (Giordano *et al.*, 1999). Cela a été observé dans le cas de la production d'acide aminoadipique, un précurseur pour la production de la céphalosporine dans *Streptomyces clavuligerus* et *Cephalosporium acremonium*, la biosynthèse de la spiramycine dans *Streptomyces ambofaciens* (Lebrihi *et al.*, 1992; Tang *et al.*, 1994; Lounes *et al.*, 1995; Lee *et al.*, 1997) et la biosynthèse de gibbérélline par *G. fujikuroi* (Tudzynski *et al.*, 1998). La répression catabolite peut affecter aussi le niveau des activités enzymatiques nécessaire dans les voies du métabolisme secondaire. La concentration des ions ammonium dans le milieu de culture influence la production de l'acide citrique par *A. niger* (Bizukojc et Ledakowicz, 2003). De plus, la production de FK-506, un immunosuppresseur

synthétisé par *Streptomyces* sp. est fortement réprimée par la présence de l'ammonium en excès (Yoon et Choi, 1997). Par ailleurs, les acides aminés peuvent être partagés parmi ceux qui stimulent, inhibent ou restent neutres envers la production des métabolites secondaires (spiramycine), selon leur capacité à excréter des ions ammonium dans le milieu de culture ou à permettre l'accumulation des précurseurs pendant leur assimilation par *Streptomyces ambofaciens* (Untrau *et al.*, 1994).

Dans le cas de tous les composés caractérisés, nous avons clairement remarqué que les acides aminés ont permis une meilleure production que les sources de l'azote minérales. Ceux-ci exerceraient une régulation catabolite par les ions ammonium. Ceci était en accord avec Fraleigh *et al.* (1989) et Rosfarizan et Ariff (2000) lesquels ont rapporté que les sources de l'azote organiques étaient favorables à la production d'acide kojique par *Aspergillus flavus* en comparaison des sources d'azote inorganiques. Les trois acides aminés testés pourraient fournir des précurseurs intéressants pour la biosynthèse du composé **1**. Ceci est envisageable d'autant que la production de ce composé est probablement associée à la phase d'assimilation et de dégradation des acides aminés mentionnés. Ceci était en accord avec Lara *et al.* (1982) qui ont rapporté que le glutamate peut induire la formation de la pénicilline G dans *Penicillium chrysogenum*. D'autre part, quelques acides aminés doivent également être considérés comme des précurseurs pour les métabolites secondaires, et pas uniquement comme sources nutritives (Shapiro, 1989). Quelques exemples de ce type de régulation incluent la phénylalanine dans la formation de l'alcaloïde benzodiazépine (Luckner *et al.*, 1977). Dans le cas du composé **2**, les phénomènes sont plus complexes.

Parmi les acides aminés étudiés, seul l'acide glutamique a permis une bonne production spécifique. Les deux autres acides aminés sont de mauvaises sources d'azote pour la biosynthèse des composés **2**, **3** et **4**. Ceci était en accord avec Bo-Shim et Woloshuk (1999) lesquels ont rapporté que l'addition d'alanine et de la méthionine au milieu de culture a réduit la production de fumonisine B1 chez *Gibberella fujikuroi*. D'autre part, les ions ammonium permettent une production faible, cependant lorsque le nitrate est associé à l'ammonium, la production est rehaussée.

L'acide glutamique sert de source pour les intermédiaires du cycle de Krebs, les acides aminés et pour les précurseurs de l'ARN (Voelker et Altaba, 2001). Tout rôle régulateur assigné à cet acide aminé dans la biosynthèse des métabolites secondaires devrait considérer cet effet catabolique. Le glutamate utilisé dans le milieu de culture comme unique source de l'azote permet une croissance rapide sans phase de latence. Pour cette raison, le glutamate a paru être la source de

l'azote la plus disponible parmi les sources minérales et organiques étudiées. Le glutamate est également reconnu pour être une excellente source d'azote pour la production de la fumagilline, synthétisée par *A. fumigatus* (Williams et Katz, 1977; Yang *et al.*, 2003).

CHAPITRE II

**Effet de certaines sources de carbone et d'azote sur la production
des métabolites lactoniques isolés du mutant *A. ochraceus* M18,
non producteur d'ochratoxine A**

I. INTRODUCTION

Les mycotoxines sont des métabolites secondaires, synthétisés par des champignons filamenteux. Ces molécules, absorbées naturellement à de faibles concentrations peuvent induire une réponse toxique chez les vertébrés supérieurs et les autres animaux (Smith et Moss, 1985; Gqaleni *et al.*, 1997). Alors que, certaines mycotoxines sont produites seulement par un nombre limité d'espèce fongique, d'autres peuvent être produites par plusieurs espèces de différents genres (Frisvad et Filtenborg, 1989; Pitt et Leistner, 1991). Il est de plus en plus évident que la plupart des champignons toxinogéniques ont la possibilité de produire plus d'une mycotoxine (Frisvad et Samson, 1991; Coker, 1995).

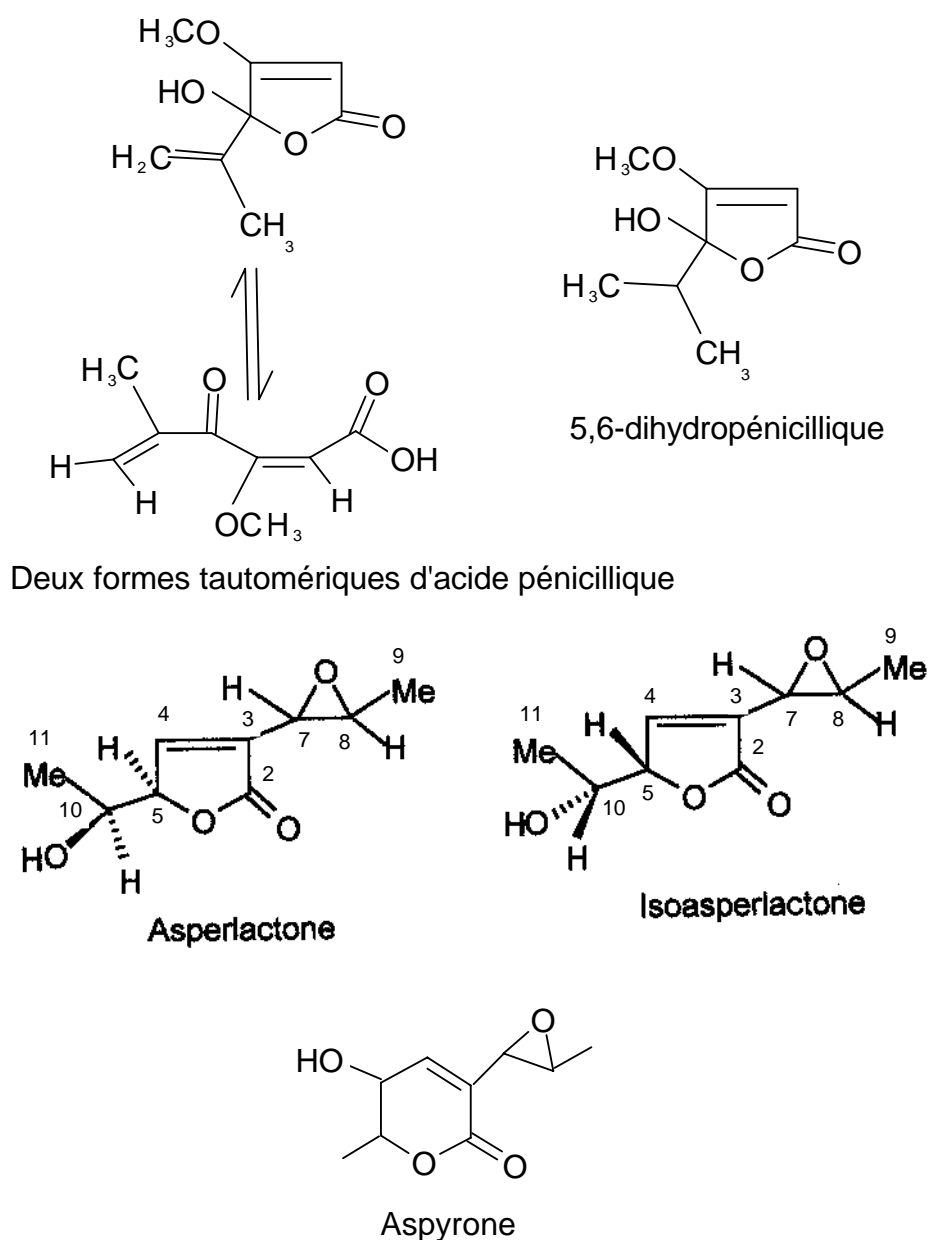


Fig. 31. Les structures chimiques de composés lactoniques

L'acide pénicillique (AP) (Fig. 31) est une mycotoxine classique produite par plusieurs champignons, y compris par des souches des genres du *Penicillium* et *Aspergillus* (Smith et Moss, 1985; Nielsen, 2003). Avec l'acide dihydropenicillique (ADHP), l'asperlactone, l'isoasperlactone et la patuline, il constitue chimiquement une classe de lactone cyclique à cinq membres relativement simple, qui dû à sa toxicité et sa carcinogénicité est considéré pour être un risque potentiel de la santé humaine et animale (Shan *et al.*, 1997 ; Bando *et al.*, 2003). La toxicité de l'acide pénicillique est provoquée par sa réaction avec les enzymes, cependant il a été montré qu'il pouvait réagir avec plusieurs acides aminés et engendrer des produits moins toxiques.

L'acide pénicillique n'est pas considéré comme un composé mutagénique par le test d'Ames (Ueno *et al.*, 1978), bien qu'il induise des ruptures d'ADN dans les cellules mammifères (Umeda *et al.*, 1977; Mori *et al.*, 1984). Plusieurs champignons, y compris *A. ochraceus*, isolés à partir de produits alimentaires moisissés, produisent de l'acide pénicillique et de l'acide dihydropenicillique (Ciegler et Kurtzman, 1970; Diacre, 1980; Sunesen et Stahnke, 2003). AP pouvant se convertir en acide dihydropenicillique sous des conditions nutritives très riches (Obana *et al.*, 1995).

L'acide orsellinique dérive d'une chaîne du poly- β -ketomethylene. Il est considéré comme le premier précurseur de la biosynthèse de l'AP. Ce précurseur est transformé d'abord en 6-methylsalicylique avant de subir différentes réactions (Voir Fig.32) aboutissant à l'AP (Sekiguchi *et al.*, 1987). Ce pendant, la voie de biosynthèse de l'AP reste très peu étudié à nos jours.

Asperlactone a été isolé pour la première fois chez *Aspergillus* sp. en 1970 (Rosenbrook et Carney, 1970). Par la suite, plusieurs études ont montré que ce métabolite est produit par *A. melleus* (Garson *et al.*, 1984) et *A. ochraceus* (Torres *et al.*, 1998) alors que, l'isoasperlactone n'est produit que par *A. melleus* (Staunton et Sutkowski, 1991). Aucune étude n'a montré que ce métabolite est produit par *A. ochraceus*. Les deux asperlactones ont la même structure chimique mais ils sont des stéréochimiques différents. L'asperlactone est biosynthétisé à partir d'aspyrone par décarboxylation et arrangements des intermédiaires du polycétone suivis par l'ouverture stéréospécifique du cercle de l'époxy (Brereton *et al.*, 1984). Aspyrone et asperlactone montrent d'une part une activité régulatrice de la croissance d'insectes contre le *Tribolium castaneum* et d'autre part une activité ovicidale contre le *Nezara viridula*. L'asperlactone est plus actif que l'aspyrone (Balcells *et al.*, 1995). L'asperlactone possède également des activités antibactériennes et antifongiques (Torres *et al.*, 1998).

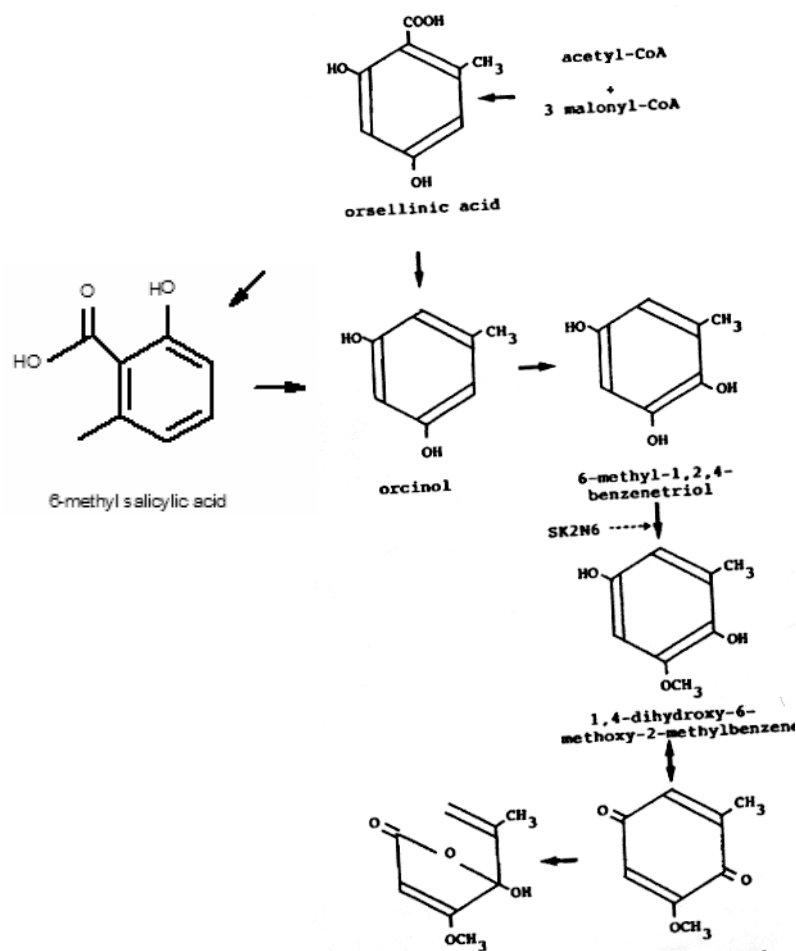


Fig. 32. Biosynthèse d'acide pénicillique

Les sources des carbone et azote sont nécessaires pour la croissance et la formation des produits dans la culture microbienne. La nature de ces substrats joue un rôle prédominant dans le métabolisme du micro-organisme (Anderson et Jayaraman, 2003). Très peu d'études ont été menés jusqu'à maintenant sur la régulation de la biosynthèse des mycotoxines par les sources de carbone et d'azote.

Le présent travail s'est concentré dans un premier temps sur l'étude de l'influence des sources de carbone et d'azote comme facteurs d'élément nutritif qui peuvent affecter et contrôler la production des dérivés d'acide pénicillique ainsi que sur la production d'asperlactone et d'isoasperlactone dans les cultures de milieu synthétique liquide par *A.*

ochraceus M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174. L'activité biologique de l'asperlactone et de l'isoasperlactone a également été testée.

II. LES RÉSULTATS

II.1. Isolement et purification des métabolites lactoniques

A. ochraceus M18 a été choisi pour sa capacité de produire plusieurs nouvelles molécules (chapitres 1). Les molécules étudiées dans ce chapitre sont produites également par *A. ochraceus* NRRL 3174, ce pendant avec un faible rendement. C'est la raison pour la quelle notre choix s'est porté sur *A. ochraceus* M18. L'analyse également de l'extrait brut par CCM montre la présence de différentes tâches. Celle ayant un R_f de 0,58 a été récupérée et fractionnée par HPLC. L'acide pénicillique, l'acide dihydropénicillique, l'asperlactone et l'isoasperlactone présentent 11, 13, 7,5 et 5,5 min respectivement comme temps de rétention.

II.2. Elucidation de la structure des métabolites lactoniques

Les structures de l'acide pénicillique et de l'acide dihydropénicillique ont été confirmés par les analyses UV et le spectre de masse, et en comparant leurs spectres de masse avec ceux relevés dans la littérature. Les deux composés présentent la même longueur d'onde maximale ($\lambda_{\max} = 229$ nm). La masse pour l'acide pénicillique et le dihydropénicillique était de 170 (M^+) et de 172 (M^+) respectivement.

Par contre, les structures d'asperlactone et d'isoasperlactone ont été déterminées par UV, le spectre de masse, Infra rouge (IR) et $^1H/^{13}C$ RMN. L'analyse du spectre IR de l'un des deux derniers métabolites (TR = 7,5 min) montre la présence d'une bande à 1715 cm^{-1} . Cette bande indique la présence d'un groupe carbonyle. La présence de deux bandes à $\sim 900\text{ cm}^{-1}$ et $\sim 1200\text{ cm}^{-1}$ révèle la présence du groupe époxyde conjugué au cercle du lactone. La présence de groupe hydroxyle a été indiquée par l'absorption IR à 3378 cm^{-1} . Le spectre 1H RMN montre des signaux typiques à δ 6,54 (1H, m, H-4) et 4,09 (1H, m, H-5). En outre, un ensemble de signaux à δ 3,37 (1H, t, $J = 7,35$; 7,56 et 7,85, H-7) et 2,89 (1H, m, H-8) pour l'époxyde, et 1,30 (3H, quintet, $J = 8,46$ et 8,25, Hz, H-9) pour groupe méthyle et enfin 4,25 (1H, m, H-10) et 1,32 (3H, dd, $J = 0,58$ et 8,35, Hz, H-11) pour le groupe de l'éthanol ont été observés. Le ^{13}C RMN a révélé 9 carbones et le spectre DEPT a suggéré la présence de 2 méthyles, 5 méthines et 2 carbones quaternaires. L'ensemble de ces données a permis la déduction de la formule suivante $C_9H_{12}O_4$. La structure chimique correspond à celle de l'asperlactone (Fig. 31).

De la même façon, le spectre de masse, ^1H RMN et ^{13}C RMN du second métabolite ($R_T = 5,5$ min) était identique à celui de l'asperlactone. Les deux structures sont semblables à l'exception de H-5 et H-10. Dans l'asperlactone, le proton (H-5) a été affecté par les protons avoisinants pour donner 9 signaux dans le spectre ^1H RMN et 6 signaux dans le cas du second métabolite. En outre, le proton (H-10) a montré 8 signaux dans l'asperlactone et 5 signaux dans le second métabolite. L'ensemble des résultats suggère que ce métabolite est l'isoasperlactone (Fig. 31).

Les propriétés physicochimiques d'acide pénicillique (AP), d'acide dihydropénicillique (ADHP), d'asperlactone (ASP) et d'isoasperlactone (ISOASP) sont résumées dans le tableau 8.

Tableau 8. Propriétés physicochimiques des métabolites lactoniques produites par *A. ochraceus* M18.

| Propriétés | AP | ADHP | ASP | ISOASP |
|--|--|--|--|---|
| Apparence | Plaques rhomiques ou hexagonales | Aiguilles | cristaux blancs | Huile jaune |
| Formule moléculaire | $C_8H_{10}O_4$ | $C_8H_{12}O_4$ | $C_9H_{12}O_4$ | $C_9H_{12}O_4$ |
| Poids moléculaire | 170 | 172 | 184 | 184 |
| MS (nano-spray ESI/MS), m/z : | 171 (M+H) ⁺ , 153 (171-H ₂ O), 125 (171-H ₂ O-CO) | 171 (M-H) ⁻ , 172 (M) ⁺ , 153 (171- H ₂ O), 139 (171- H ₂ O-CH ₂), 127 (171-H ₂ O-C ₂ H ₂), 101 (171-H ₂ O- 2C ₂ H ₂), 95 (171- H ₂ O-C ₂ H ₂ -O ₂). | 183 (M-H) ⁻ , M ⁺ (184), 165 (183-H ₂ O), 139 (183-H ₂ O- C ₂ H ₂), 121 (183-2H ₂ O- C ₂ H ₂). | 183 (M-H) ⁻ , M ⁺ (184), 165 (183-H ₂ O), 139 (183- H ₂ O-C ₂ H ₂), 121 (183- 2H ₂ O-C ₂ H ₂). |
| UV λ_{max} nm dans méthanol | 229 (ε 11100) | 229 nm (ε 11100) | 227 nm | 227 nm |
| IR (KBr) | | | 3378,2982, 1715, 1646,1385, 1221, 1131, 1061, 940 | |
| ¹H RMN, 400 MHz dans DMSO (δ, mult. J) | | | 6,54 (1H, H-4), 4,09 (1H, m, H-5), 3,37 (1H, t, J = 7,35 ; 7,56 et 7,85 Hz, H-7), 2,89 (1H, m, H-8), 1,30 (3H, q, J = 8,25 et 8,46 Hz, H-9), 4,25 (1H, m, H-10), 1,32 (3H, dd, J = 0,58 et 8,35 Hz, H-11), 2,06 (1H, s, OH-10) | 7,32 (1H, d, J = 4,75 & 4,05 Hz, H-4), 4,87 (1H, m, H-5), 3,44 (1H, s, J = 8,88 Hz, H-7), 3,19 (1H, m, H-8), 1,44 (3H, t, J = 21,52 Hz, H-9), 4,06 (1H, quintet, J = 3,31 Hz, H- 10), 1,33 (3H, m, H-11), 2,07 (1H, s, OH-10) |
| ¹³C PMN, 100 MHz dans DMSO (δ) | | | 163,7 (C-2), 128,2 (C-3), 144,4 (C-4), 67,1 (C-5), 55,0 (C-7), 58,5 (C-8), 18,2 (C-9), 79,8 (C-10), 18,6 (C- 11) | 171,7 (C-2), 133,7 (C-3), 147,1 (C-4), 85,4 (C-5), 52,7 (C-7), 58,6 (C-8), 18,1 (C-9), 68,2 (C-10), 19,3 (C-11) |

II.3. Le test biologique

L'activité biologique a été effectuée pour seulement l'asperlactone et l'isoasperlactone grâce à leurs importances biologiques comme des composés antibactériens et antifongiques et pas des mycotoxines tels que l'AP et l'ADHP. Donc, le teste biologique a été effectuée pour déterminer la concentration minimale d'inhibition de ces composés contre les micro-organismes testées.

La méthode du disque par le papier filtre a été employée pour l'étude *in vitro* des effets antimicrobiens contre *Micrococcus luteus* (*M.luteus*), *Bacillus subtilis* (*B. subti*), *Staphylococcus aureus* (*S. aur*), *Klebsiella pneumoniae* (*Kleb.pn*), *Mucor ramannianus* (*Mucor.r*), *Pseudomonas fluorescens* (*Ps.flu*), *Lactobacillus casei* (*Lb.casei*), (*Escherschia coli*) *E. coli*, *Lactobacillus bulgaricus* (*Lb. bulg*) et *Saccharomyces cerevisiae* (*Sc*). Les effets inhibiteurs d'asperlactone et d'isoasperlactone contre ces organismes sont montrés dans le tableau 9.

Les résultats des antibiogrammes indiquent que l'asperlactone et l'isoasperlactone ont montré des activités antimicrobiennes. L'asperlactone inhibe fortement plusieurs types des microorganismes (*Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Mucor. r*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Bacillus subtilis*) comparé à l'isoasperlactone (*Bacillus subtilis* et *Micrococcus luteus*). La concentration minimale d'inhibition d'asperlactone et d'isoasperlactone contre les micro-organismes testés est d'environ 200 µg/mL.

Tableau 9

L'antibiogramme d'asperlactone et d'isoasperlactone, qui ont été séparés d'*A. ochraceus* M18, les zones d'inhibition (en mm).

| Composé | Conc(µg/ml) | Souches | | | | | | | | | |
|-----------------|-------------|---------|--------|---------|----------|----------|---------|--------|----------|----|----------|
| | | Mucor.r | Ps.flu | Kleb.pn | M.luteus | Lb.casei | E. coli | S. aur | Lb. bulg | Sc | B. subti |
| Asperlactone | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 200 | 9 | - | - | 11 | - | 12 | - | - | 15 | 20 |
| | 300 | 10 | - | - | 15 | - | 15 | - | - | 17 | 23 |
| Isoasperlactone | 20 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 50 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 100 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| | 200 | - | - | - | 11 | - | - | - | - | - | - |
| | 300 | - | - | - | 14 | - | - | - | - | - | - |
| Température °C | | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 30 | 37 | 30 | 30 |
| Incubation | | 24h | | | | | | | | | |

- non inhibition

II.4. Effet des sources de carbone sur la croissance et sur la production des métabolites lactoniques

A- Effet sur la croissance et sur la production spécifique de l'acide pénicillique et de l'acide dihydropénicillique chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

Le tableau 10 représente l'effet de différentes sources du carbone sur le poids sec maximum (PS_{\max}), le taux spécifique de croissance (μ_{\max}), la production spécifique de l'acide pénicillique et de l'acide dihydropénicillique dans le milieu synthétique liquide chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

Tableau 10

Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique d'acide pénicillique (AP) et d'acide dihydropénicillique (ADHP) chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| C source | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> M18 | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | |
|------------|------------------------------------|---|---|-------|------------------------------------|---|---|------|
| | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | AP | ADHP | | | AP | ADHP |
| Glucose | 0,023 | 14,17 | 33,88 | 2,89 | 0,035 | 22,29 | 32,78 | 1,38 |
| Fructose | 0,021 | 21,14 | 5,53 | 0,13 | 0,035 | 23,44 | 6,50 | 0,20 |
| Saccharose | 0,025 | 16,25 | 39,04 | 4,55 | 0,023 | 36,23 | 23,56 | 4,49 |
| Amidon | 0,023 | 11,34 | 65,55 | 10,28 | 0,014 | 22,59 | 68,73 | 4,17 |
| Dextrine | 0,019 | 6,93 | 122,48 | 15,08 | 0,037 | 11,37 | 90,72 | 7,39 |
| Glycérol | 0,012 | 9,01 | 0 | 0 | 0,013 | 12,99 | 2,99 | 0,34 |

La comparaison des vitesses de croissance montre que l'exposition aux UV a perturbé légèrement la métabolisation du glucose, du fructose et des dextrines. Puisque ces sucres permettent une faible croissance chez *A. ochraceus* M18 comparativement à la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

La production de l'acide pénicillique et de l'acide dihydropénicillique est influencée de la même manière, par les sources de carbone, quelque soit la souche utilisée. Le glycérol et le fructose sont les deux plus mauvaises sources pour la production. Dans le cas des deux souches (*A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174) et concernant les deux métabolites (l'acide pénicillique et l'acide dihydropénicillique), les meilleures productions spécifiques sont obtenues en présence des dextrines (122,48 mg/g PS, 15,08 mg/g PS et 90,72 mg/g PS, 7,39 mg/g PS pour l'AP et l'ADHP chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174, respectivement) suivi par l'amidon (65,55 mg/g PS, 10,28 mg/g PS et 68,73 mg/g PS, 4,17 mg/g PS pour l'AP et l'ADHP chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174, respectivement). Le glucose et le saccharose permettent des productions moyennes. Elles sont d'environ 23- 39 mg/g PS pour l'acide pénicillique et de 1,4 - 4,5 mg/g PS pour l'acide dihydropénicillique.

Le comportement cinétique de l'acide pénicillique et dihydropénicillique semble être relativement le même chez les deux souches, le mutant *A. ochraceus* M18 (Fig. 33) et la souche parentale *A. ochraceus* NRRL 3174 (Fig. 34). Dans le cas de l'acide pénicillique, à l'exception du fructose et du glycérol, la production spécifique est précoce. Elle passe par un maximum obtenu après 5 à 7 jours chez le mutant et après 5 à 9 jours chez le sauvage. Après cette période, la production chute fortement. La chute de la quantité du produit est due probablement à des phénomènes de dégradation ou de transformation de l'acide pénicillique vers d'autres produits tel que l'acide dihydropénicillique, par exemple.

La différence la plus importante entre le mutant et le sauvage réside dans le fait qu'en présence de dextrines le maximum d'acide pénicillique est obtenu relativement tardivement (9 jours) chez le sauvage alors qu'il est précoce chez le mutant (5 jours) (Fig. 35a).

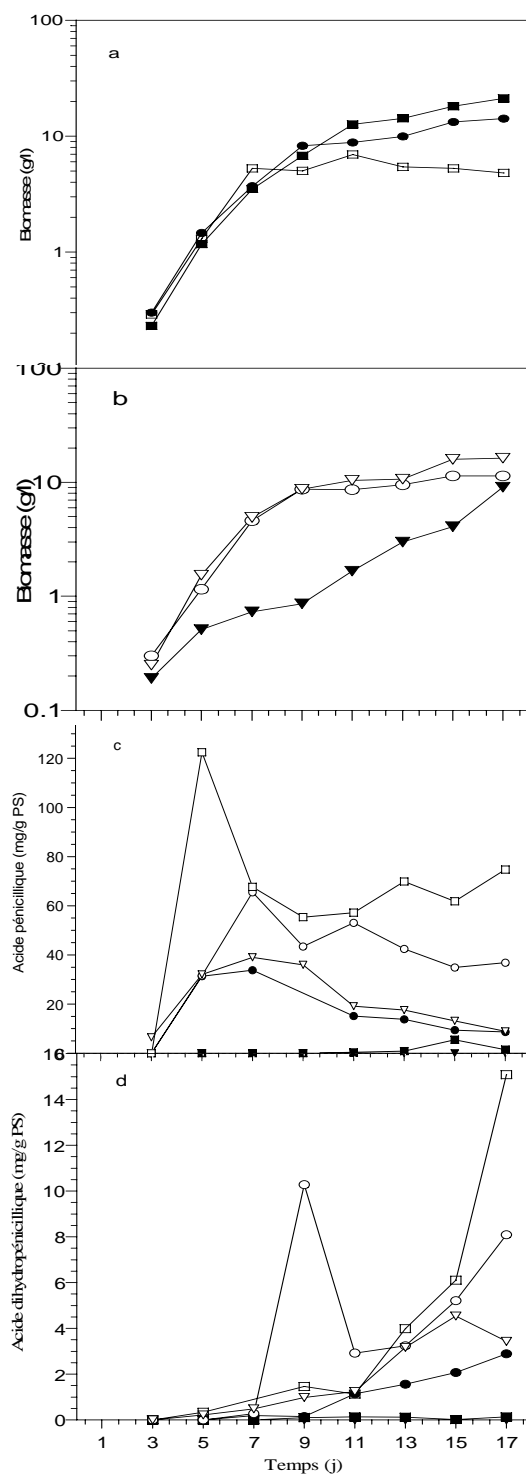


Fig. 33. Effet du glucose (●), du fructose (■), des dextrines (□), de l'amidon (○), du saccharose (▽), et du glycérol (▼) sur la biomasse (a,b) et sur la production spécifique d'acide pénicillique (c) et d'acide dihydropénicillique (d) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

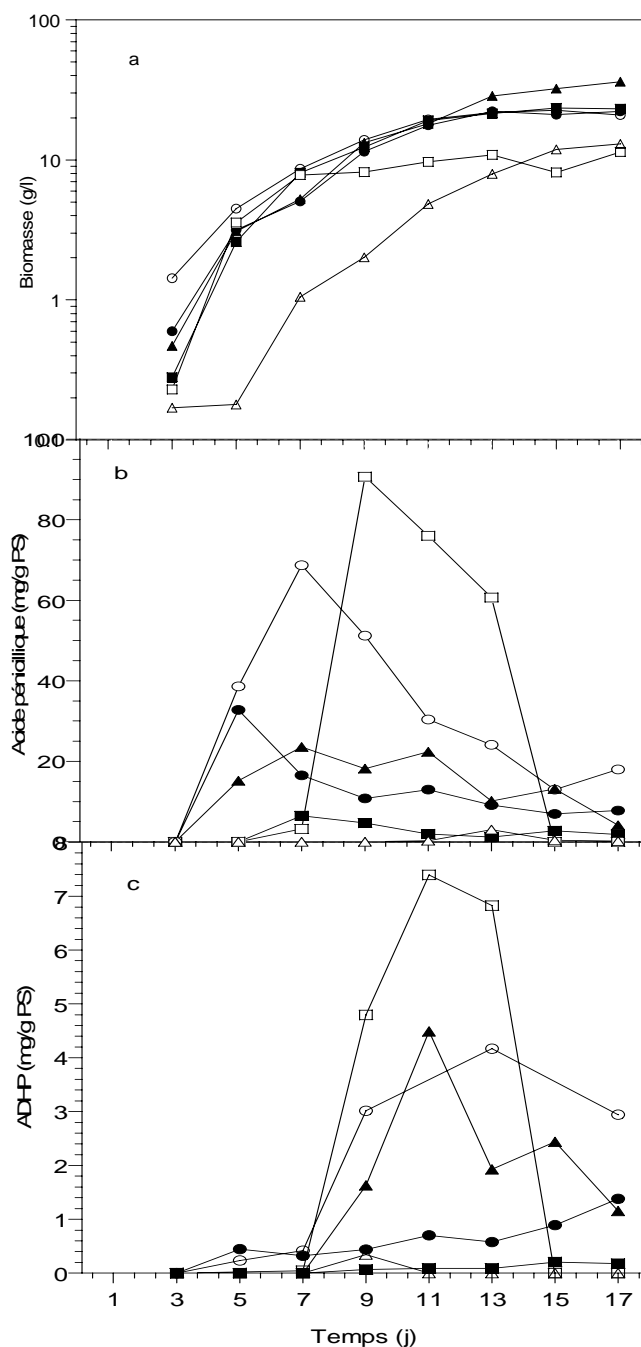


Fig. 34. Effet du glucose (●), du fructose (■), du saccharose (▲), de l'amidon (○), des dextrines (□) et du glycérol (Δ) sur la biomasse (a) et sur la production spécifique d'acide pénicillique (b) et d'acide dihydropénicillique (c) chez *A. ochraceus* NRRL 3174 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

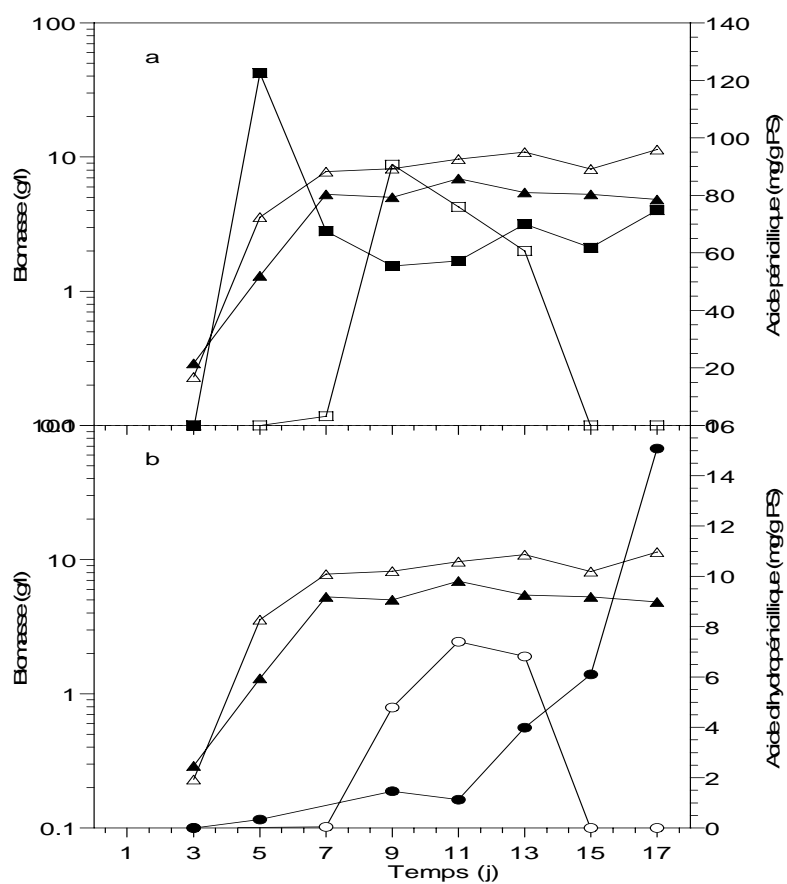


Fig. 35. Effet de dextrines comme unique source de carbone sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique d'acide pénicillique (■, □) (a) et d'acide dihydropénicillique (●, ○) (b) chez *A. ochraceus* M18 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

B- Effet sur la croissance et sur la production spécifique d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174

Le rapport entre le poids sec maximum (PS_{\max}), le taux de croissance, la production spécifique d'asperlactone et d'isoasperlactone en présence de sources différentes du carbone chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174 est résumé dans le tableau 11.

Tableau 11

Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique d'asperlactone (ASP) et d'isoasperlactone (ISOASP) chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| C source | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> M18 | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | |
|------------|------------------------------------|---|---|--------|------------------------------------|---|---|--------|
| | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | ASP | ISOASP | | | ASP | ISOASP |
| Glucose | 0,023 | 14,17 | 100,18 | 36,48 | 0,035 | 22,29 | 63,46 | 19,97 |
| Fructose | 0,021 | 21,14 | 50,79 | 23,36 | 0,035 | 23,44 | 33,82 | 8,55 |
| Saccharose | 0,025 | 16,25 | 100,42 | 44,11 | 0,023 | 36,23 | 66,05 | 13,18 |
| Amidon | 0,023 | 11,34 | 145,23 | 96,04 | 0,014 | 22,59 | 77,56 | 19,39 |
| Dextrine | 0,019 | 6,93 | 216,08 | 127,83 | 0,037 | 11,37 | 157,17 | 34,59 |
| Glycérol | 0,012 | 9,01 | 0,29 | 0,54 | 0,013 | 12,99 | 16,00 | 2,58 |

Dans le cas des deux souches, la production spécifique est meilleure en présence des dextrines, suivie par l'amidon, le saccharose, le glucose, le fructose et le glycérol. Ce dernier reste toujours la plus mauvaise source de carbone pour la production de ces métabolites.

D'une façon générale, dans le cas de ces expériences, la production spécifique est favorisée d'abord par les polysaccharides, suivie par les disaccharides et enfin par les monosaccharides. Dans le cas de ces derniers, le glycérol est la plus mauvaise source de carbone.

L'analyse de la cinétique de l'asperlactone et de l'isoasperlactone ne fait sortir aucune production séquentielle comme dans le cas de l'AP et l'ADHP.

Ces deux métabolites sont produits après 3 à 5 jours d'incubation à l'exception des cultures en présence du fructose et du glycérol où la production est tardive (après 9 jours d'incubation).

La différence la plus importante entre *A. ochraceus* M18 (Fig. 36) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (Fig. 37) réside au niveau de production de l'isoasperlactone et de l'asperlactone.

En effet, chez *A. ochraceus* NRRL 3174, la production de ces métabolites atteint un maximum après 7 jours d'incubation et sa concentration dans le milieu de culture chute rapidement après 13 jours de fermentation chez la souche parentale *A. ochraceus* NRRL 3174, alors que chez *A. ochraceus* M18, l'accumulation de l'asperlactone et de l'isoasperlactone est continue jusqu'à la fin de la culture (17 jours).

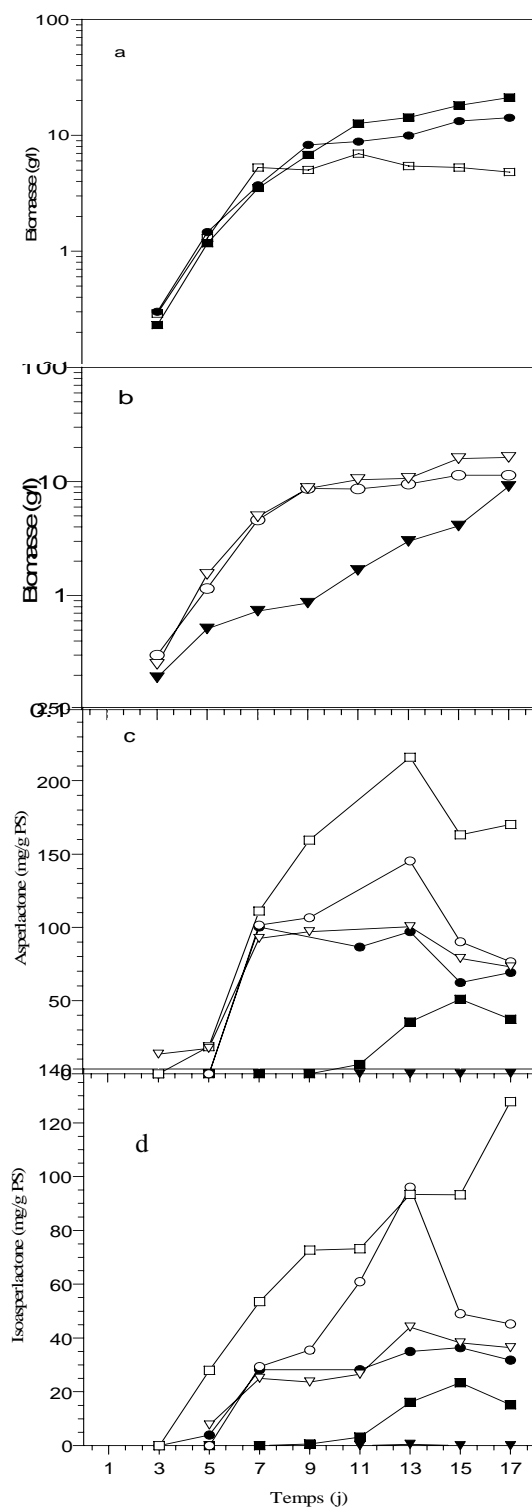


Fig. 36. Effet du glucose (●), du fructose (■), des dextrines (□), de l'amidon (○), du saccharose (▽) et du glycérol (▼) sur la biomasse (a,b) et sur la production spécifique d'asperlactone (c) et d'isoasperlactone (d) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

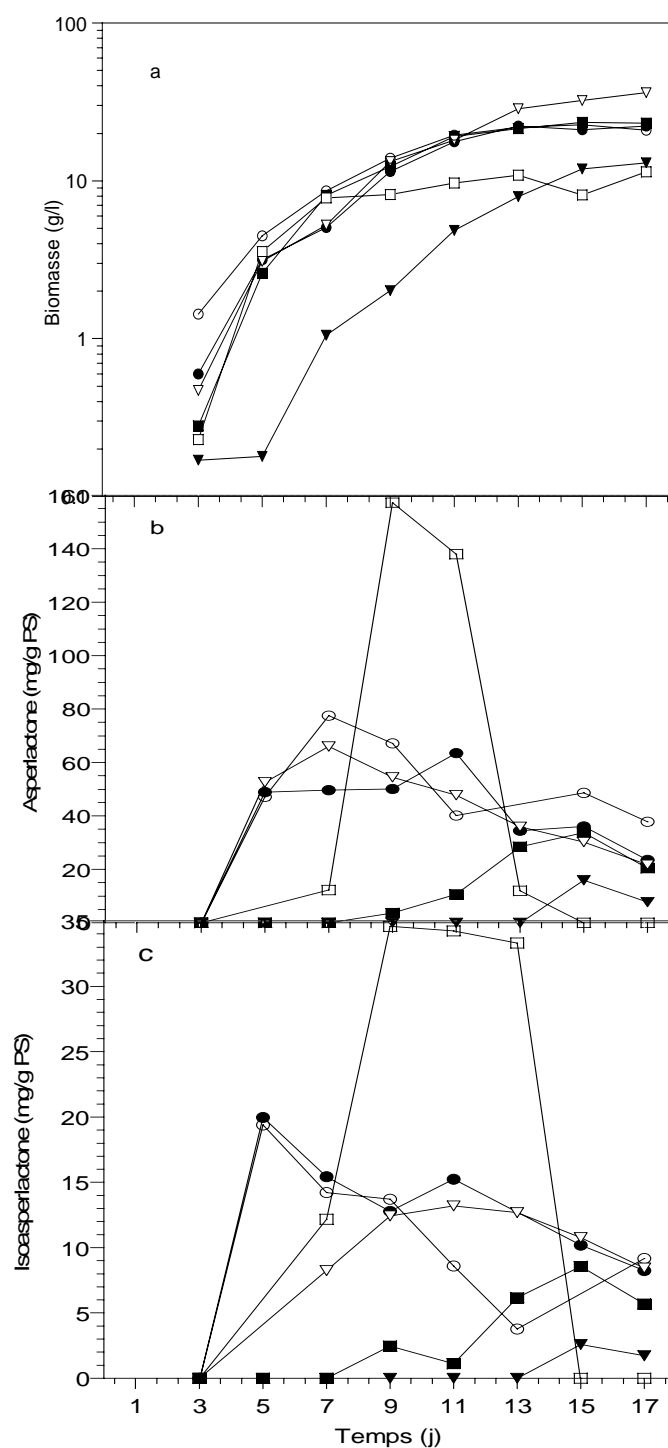


Fig. 37. Effet du glucose (●), du fructose (■), des dextrans (□), de l'amidon (○), du saccharose (▽), et du glycérol (▼) sur la biomasse (a) et sur la production spécifique d'asperlactone (b) et d'isoasperlactone (c) chez *A. ochraceus* NRRL 3174 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

II.5. Effet des sources d'azote sur la croissance et sur la production des métabolites lactoniques

A- Effet sur la croissance et sur la production spécifique d'acide pénicillique et d'acide dihydropénicillique chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174

A. ochraceus NRRL 3174 et *A. ochraceus* M18 ont été développés en présence de différentes sources d'azote (Acide glutamique, Phénylalanine, NH_4Cl et NH_4NO_3). L'évolution de la biomasse ainsi que les concentrations de l'acide pénicillique (AP) et l'acide dihydropénicillique (ADHP) ont été suivies au cours du temps. Les vitesses spécifiques de croissance ainsi que la production spécifique ont été déterminées. L'essentiel des résultats est présenté dans le tableau 12.

Tableau 12

Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique d'acide pénicillique (AP) et d'acide dihydropénicillique (ADHP) chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| N source | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> M18 | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | |
|---------------------------------|------------------------------------|---|---|------|------------------------------------|---|---|------|
| | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | AP | ADHP | | | AP | ADHP |
| Acide glutamique | 0,011 | 6,20 | 63,28 | 1,80 | 0,017 | 16,49 | 29,23 | 1,48 |
| Phényle alanine | 0,009 | 4,34 | 1,56 | 0,05 | 0,025 | 20,29 | 2,43 | 0,67 |
| NH ₄ Cl | 0,032 | 8,94 | 51,81 | 7,83 | 0,041 | 20,79 | 20,29 | 1,08 |
| NH ₄ NO ₃ | 0,033 | 13,38 | 32,44 | 3,22 | 0,030 | 21,16 | 8,67 | 5,59 |

Les deux souches présentent une vitesse de croissance plus faible sur les acides aminés que sur les ions ammonium et le nitrate. Ce pendant, dans tous les cas, la souche sauvage (Fig. 39a) se développe plus vite que le mutant *A. ochraceus* M18 (Fig. 38a). Cette dernière observation concerne également la production de la biomasse. La mutation subite par *A.*

ochraceus M18 a probablement fortement perturbé le métabolisme de l'azote. Des travaux complémentaires doivent être conduits pour mieux cerner cet aspect.

Quel que soit la nature de la source d'azote, *A. ochraceus* M18 produit plus d'acide pénicillique et/ou d'acide dihydropénicillique que *A. ochraceus* NRRL 3174. La production d'acide pénicillique est augmentée de 2 à 4 fois selon la source d'azote utilisée. Parmi ces dernières, l'acide glutamique permet une meilleure production spécifique d'acide pénicillique, suivi par NH_4Cl et NH_4NO_3 . La phénylalanine est une très mauvaise source d'azote pour la production de l'acide pénicillique. La production de l'acide dihydropénicillique est plus favorisée par l'azote minéral. Ce pendant, la quantité produite est relativement la même chez les deux souches. La production de l'acide dihydropénicillique est tardive par rapport à celle de l'acide pénicillique chez les deux souches. Dans la plupart des sources d'azote, cette production est séquentielle. Ceci est probablement dû à la transformation de l'acide pénicillique en acide dihydropénicillique.

En présence de toutes les sources d'azote testées, la production d'AP et de l'ADHP est séquentielle. La production de l'AP est plus précoce que celle de l'ADHP. Ceci est observé dans le cas du mutant (Fig. 38) comme dans le cas de la souche sauvage (Fig. 39). Dans le cas d'*A. ochraceus* M18, la production de l'AP démarre à partir du troisième jour d'incubation. Elle est maximum après 7 jours de fermentation. Après cette période, la quantité d'AP chute. Cette chute est probablement due à la transformation de l'AP en ADHP. Ce dernier apparaît après 7 jours d'incubation et continue à augmenter. A quelques nuances près des cultures d'*A. ochraceus* NRRL présente le même comportement cinétique quant à la production de l'AP et de l'ADHP. La seule différence se manifeste au niveau de la production de l'ADHP en présence de NH_4NO_3 . En effet, ce produit atteint son maximum après 13 jours de fermentation et sa concentration chute rapidement par la suite. En général, la production d'AP était meilleure en présence de sources d'azote organiques qu'en présence de sources d'azote inorganiques.

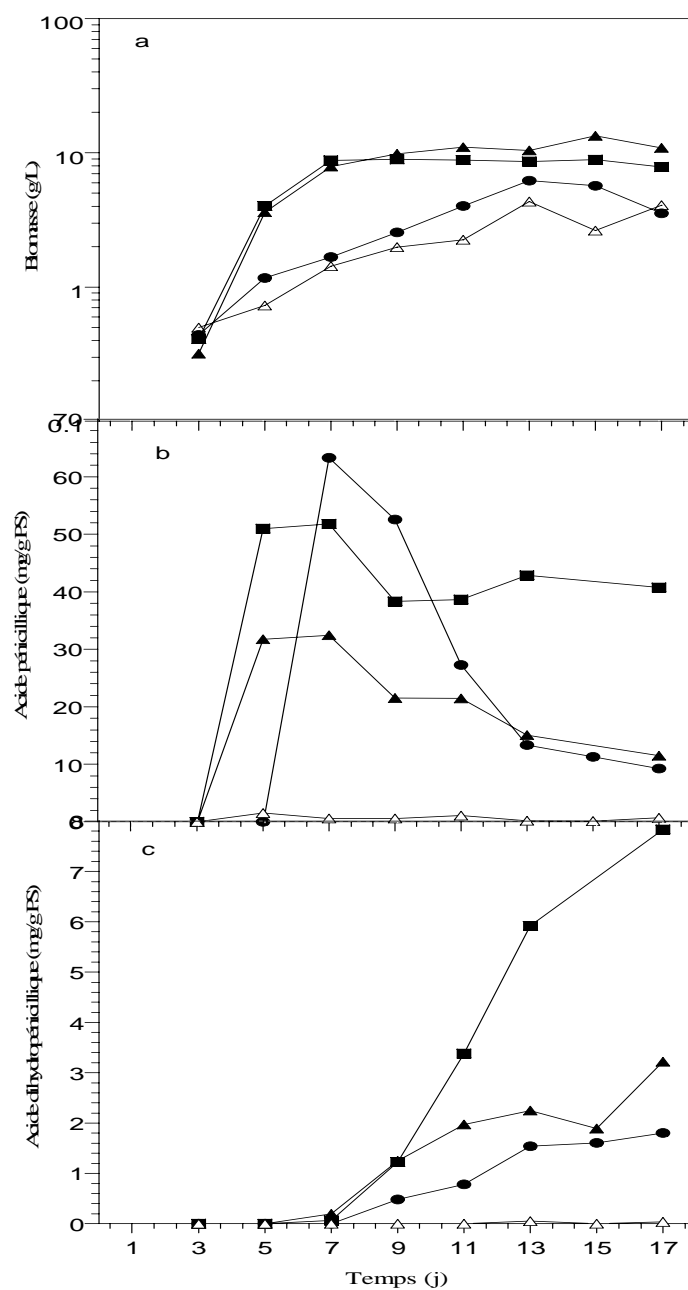


Fig. 38. Effet d'acide glutamique (●), de NH_4Cl (■), de NH_4NO_3 (▲) et de phénylalanine (Δ) sur la biomasse (a), et sur la production spécifique d'acide pénicillique (b) et d'acide dihydropénicillique (c) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu de culture contenant le glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

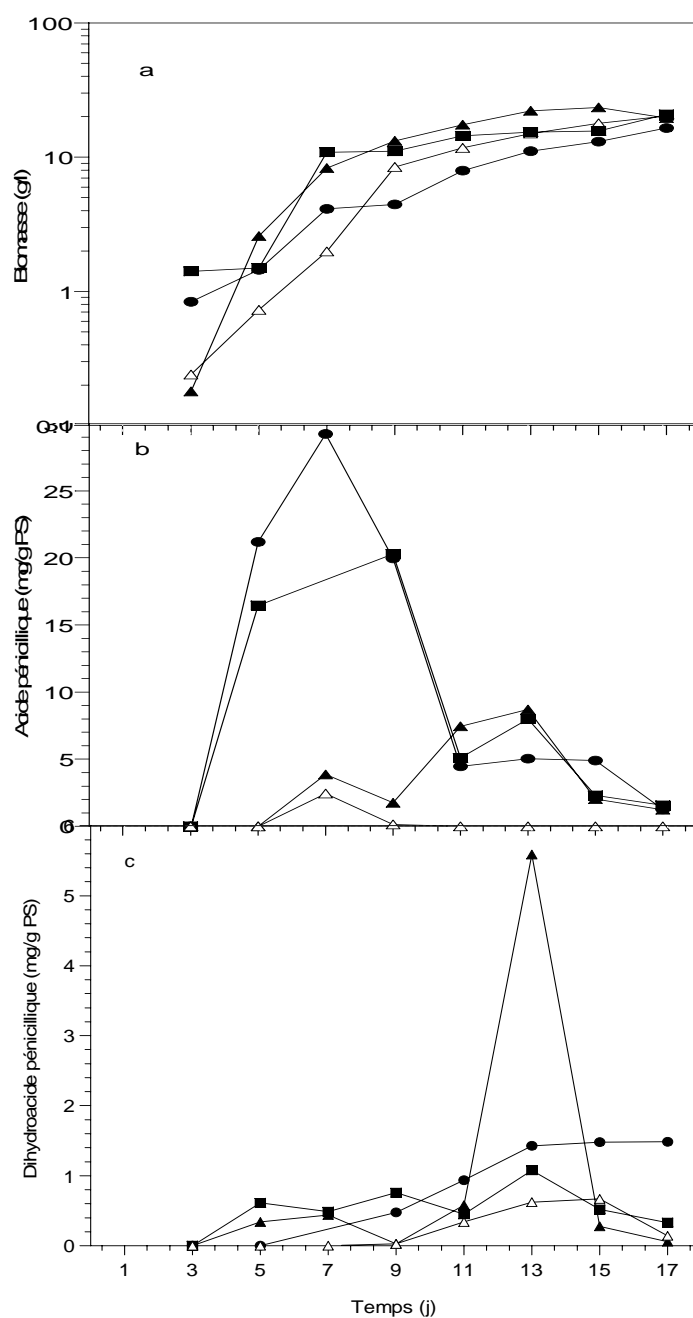


Fig. 39. Effet d'acide glutamique (●), de NH₄Cl (■), de NH₄NO₃ (▲) et de phénylalanine (△) sur la biomasse (a), et sur la production spécifique d'acide pénicillique (b) et d'acide dihydropénicillique (c) chez *A. ochraceus* NRRL 3174 dans le milieu de culture contenant le glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

B- Effet sur la croissance et sur la production spécifique d'asperlactone et d'isoasperlactone chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174

L'influence des sources différentes d'azote sur la production spécifique d'asperlactone et isoasperlactone, le poids secs (PS_{max}) et le taux spécifique de croissance (μ_{max}) chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174 est résumée dans le tableau 13.

Tableau 13

Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique d'asperlactone (ASP) et d'isoasperlactone (ISOASP) chez *A. ochraceus* M18 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| N source | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> M18 | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | |
|---------------------------------|------------------------------------|---|---|--------|------------------------------------|---|---|--------|
| | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | ASP | ISOASP | | | ASP | ISOASP |
| Acide glutamique | 0,011 | 6,20 | 175,93 | 85,67 | 0,017 | 16,49 | 71,83 | 20,92 |
| Phényle alanine | 0,009 | 4,34 | 130,22 | 70,84 | 0,025 | 20,29 | 39,24 | 13,43 |
| NH ₄ Cl | 0,032 | 8,94 | 124,42 | 72,39 | 0,041 | 20,79 | 51,49 | 17,20 |
| NH ₄ NO ₃ | 0,033 | 13,38 | 84,81 | 50,88 | 0,030 | 21,16 | 58,34 | 25,19 |

D'une façon générale, quelque soit la nature de la source d'azote utilisée, la production spécifique de l'asperlactone et de l'isoasperlactone reste plus élevée chez le mutant que chez la souche parentale. La production de l'asperlactone et de l'isoasperlactone chez le mutant semble être meilleure en présence d'acide glutamique et de phénylalanine. Paradoxalement, le NH₄Cl permet une production assez importante comparable à celle permise par la phénylalanine et les ions nitrates.

L'évolution cinétique d'asperlactone et d'isoasperlactone dépend de la source d'azote étudiée. La production spécifique de ces métabolites chez *A. ochraceus* M18 (Fig.40) commence après 5 jours d'incubation en présence de NH₄Cl et NH₄NO₃, 7 jours en présence d'acide glutamique et 9 jours en présence de phénylalanine. En générale, en présence des différentes sources d'azote utilisées, la production spécifique continue à augmenter jusqu'à 17 jours de fermentation.

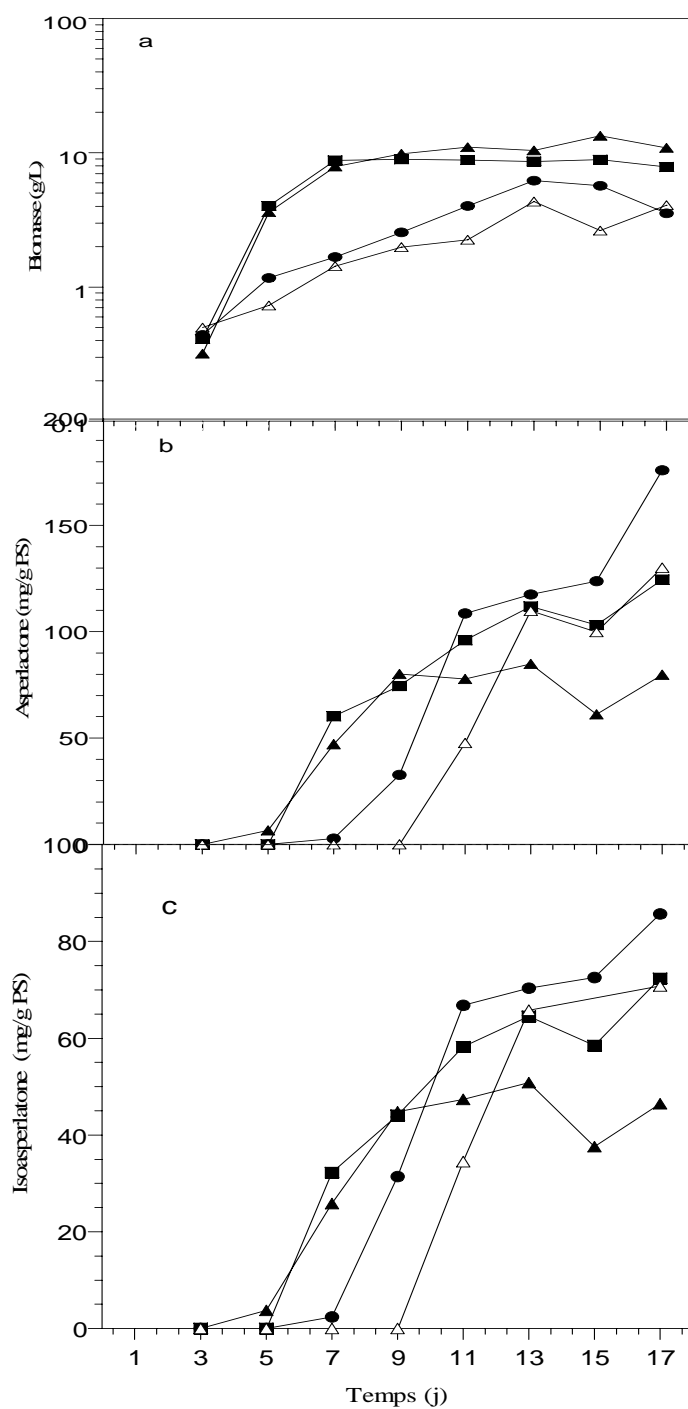


Fig. 40. Effet d'acide glutamique (●), de NH_4Cl (■), de NH_4NO_3 (▲) et de phénylalanine (Δ) sur la croissance (a) et sur la production spécifique d'asperlactone (b) et d'isoasperlactone (c) chez *A. ochraceus* M18 dans le milieu de culture contenant le glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

Le comportement cinétique de production d'asperlactone et d'isoasperlactone chez la souche parentale (Fig. 41) est relativement différent que chez la souche mutante.

Le démarrage de la production est généralement plus précoce. La différence la plus importante est que chez cette souche sauvage, la production spécifique atteint un maximum après 7 à 13 jours d'incubation. Par la suite la quantité du métabolite produit subit une dégradation ou une transformation.

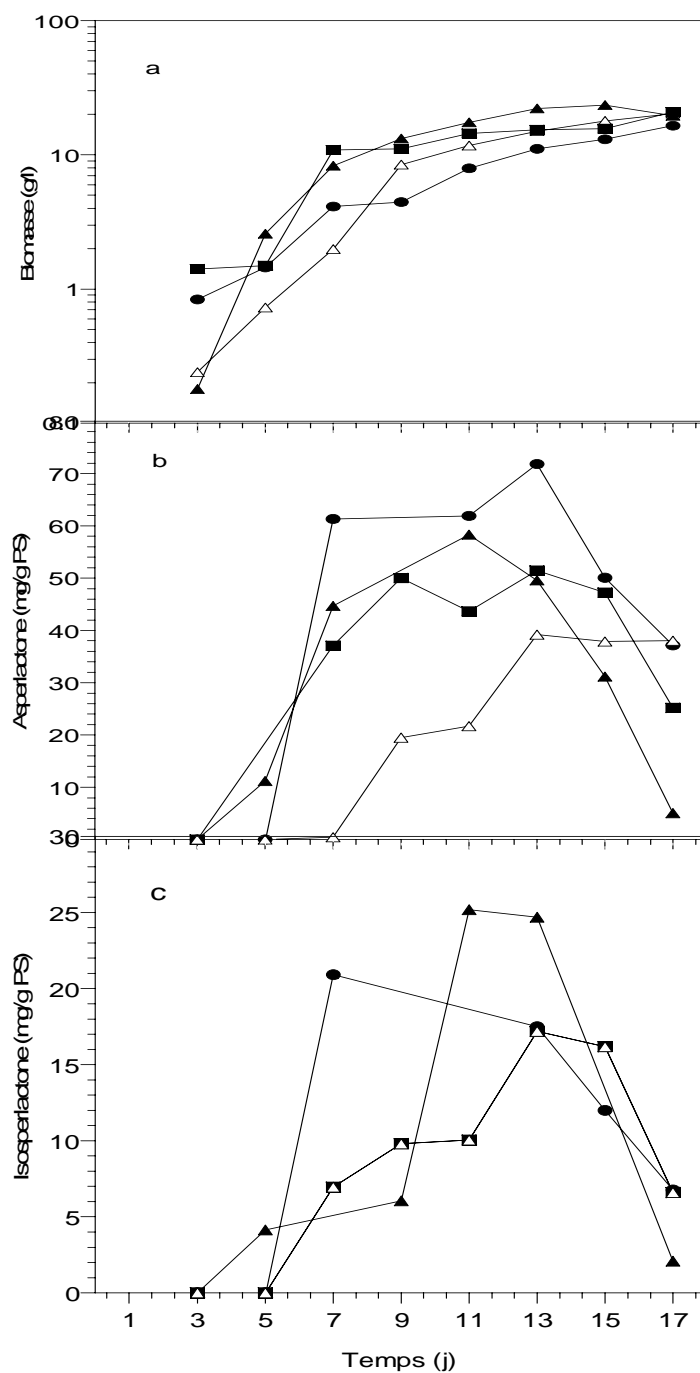


Fig. 41. Effet d'acide glutamique (●), de NH₄Cl (■), de NH₄NO₃ (▲), et de phénylalanine (Δ) sur la croissance (a) et sur la production spécifique d'asperlactone (b) et d'isoasperlactone (c) chez *A. ochraceus* NRRL 3174 dans le milieu de culture contenant le glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

III. DISCUSSION

Beaucoup de questions doivent être considérées quand la production de mycotoxine a été déterminée dans les cultures; la production des métabolites secondaires est influencée par la composition de la culture, la température et l'activité de l'eau, qui indiquent s'il est possible que les champignons produisent des métabolites différents (Ren *et al.*, 1999; Nielsen, 2002); la production de la toxine est affectée par le fait que les champignons croissent dans les cultures mélangées avec les autres moisissures et les bactéries dans les cultures (Peltola *et al.*, 2001).

Pour l'amélioration de la production qui mène à une réduction du coût de production, il est nécessaire d'améliorer la souche utilisée et d'optimiser les conditions de la fermentation pour les souches récemment isolées. Dans cette étude, nous avons isolé une souche mutante, *A. ochraceus* M18, qui a été obtenu par l'irradiation UV d'*A. ochraceus* et optimisé les conditions de la fermentation pour la croissance de la souche mutante et les productions de ces quatre métabolites étudiés.

Bien que l'ADHP et l'AP partagent la même structure chimique, peu d'attention a été prêtée au ADHP (Sassa *et al.*, 1971) et aucune information n'est disponible sur la toxicité de ce produit. Il peut y avoir deux raisons à cela. Depuis les 1960s et 1970s que l'AP est largement étudié, sa production par les moisissures est principalement détectée par une méthode fluorimétrique puis par une chromatographie sur couche mince (CCM) ou par une chromatographie gazeuse (CG) (Wilson *et al.*, 1976). Cependant, l'ADHP n'est pas détecté par fluorimétrie et l'ADHP et l'AP ne sont pas séparés par CG. Le milieu PDA (*potato dextrose agar*) a fréquemment été utilisé pour préparer une culture fongique, l'ADHP est imperceptiblement produit par *A. ochraceus* dans ce milieu. En plus, le milieu PDA utilisé pour le screening permet une faible production d'ADHP.

Dans nos résultats, la production d'AP augmente pour arriver au maximum (9-13 jours) alors que la production d'ADHP a atteint le maximum au moment de la fermentation (17 jours) dans la majorité des sources de carbone et d'azote. Ces résultats coïncident avec ceux d'Obana *et al.* (1995) lesquels ont rapporté que quand *A. ochraceus* est inoculé dans le milieu nutritif, l'AP est rapidement produit et suivi par une croissance stable d'ADHP et une baisse du niveau d'AP. De plus, le niveau de la production d'ADHP augmente lorsque l'incubation est prolongée. Par conséquent, l'ADHP est probablement produit sous forme stable à partir d'AP.

Dans nos résultats, Le plus grand effet inhibiteur d'asperlactone contre *Micrococcus luteus*, *E. coli*, *Mucor.r*, *Saccharomyces cerevisiae* et *Bacillus subtilis* comparé à celui avec

d'isoasperlactone peut être dû aux différences stéréochimiques entre les deux composés (Torres, 1998).

Plusieurs métabolites secondaires étaient contrôlés par les sources du carbone. Il n'a été cité que la croissance dans le milieu contenant le glucose, considérablement réduite en comparaison à celle observée dans le milieu contenant le saccharose (Oksman *et al.*, 1994). Tout ceci est en accord avec nos résultats, où le niveau de production des métabolites étudiés dans les disaccharides était plus élevé que cela observé dans les monosaccharides.

Dans la présente étude, la production de tous les métabolites synthétisés par *A. ochraceus* M18 était favorable en présence d'amidon et des dextrines. Ces résultats aboutissent à la même conclusion que celle donnée par Lam *et al.* (1989), qui ont rapporté qu'un niveau élevé de la production spécifique de métabolite est observé quand les dextrines et l'amidon sont utilisés comme uniques sources de carbone, avec un taux de croissance et le poids sec relativement bas, et ce qui peut être dû à l'hydrolyse lente des dextrines ou d'amidon produisant une situation de limitation du carbone et fournissant régulièrement la culture par la source du carbone.

Lindenfelser et Ciegler (1977) par contre ont rapporté que la capacité à utiliser les sources de carbone pour synthétiser AP varie largement parmi les souches de la moisissure testée, et qu'aucun modèle général ne pouvait émerger. Pour *Penicillium cyclopium* NRRL 1888, la souche qui produite la quantité la plus élevée d'AP, en utilisant le mannitol comme source du carbone est meilleure cependant les maltoses, le lactose, et le glycérol ont également donné de bons rendements. Pour *P. puberulum* NRRL 3672, la deuxième souche la plus élevée produisant l'AP, le glycérol comme source du carbone était supérieur alors que les rendements d'autres composés du carbone étaient considérablement inférieurs. Pour *P. martensii* NRRL 3612, le troisième producteur le plus élevé d'AP, le maltose et le glycérol comme sources du carbone étaient meilleures, alors que toutes les autres sources étaient inférieures. Des huit sources du carbone, l'amidon soluble était généralement très faible comme source du carbone. Le présent travail a montré que la production d'AP, d'ADHP, d'asperlactone et d'isoasperlactone est fortement inhibée par le glycérol. Ceux-ci sont par contre controversés par Lindenfelser et Ciegler (1977), comme mentionné ci-dessus.

En fait, les acides aminés peuvent être utilisés comme des sources de carbone et d'azote, et une réaction de déamination implique la production d'ion ammonium. Ceux-ci peuvent être interprétés comme la production spécifique la plus élevée des métabolites secondaires étudiés en présence d'acide glutamique comme unique source d'azote dans le milieu synthétique. Les sources d'azote peuvent être de plus classées en deux groupes d'après

leur mode d'utilisation. Les sources d'azote minérales, d'ammonium et de nitrate ont été utilisées comme source d'azote seulement. Les sources d'azote organiques, de glutamate et d'alanine ont été utilisées comme sources d'azote et du carbone (Voelker et Altaba, 2001).

Les plusieurs études, qui utilisent le milieu synthétique, ont montré que l'addition des acides aminés tels que la valine, la lysine, l'alanine et le glutamine dans ce milieu, augmente la production de la spiramycine, alors que l'addition d'autres acides aminés tels que l'arginine n'avaient aucun effets sur la production de la spiramycine (Omura et Tanaka, 1986; Vancura *et al.*, 1988). De la même façon, la production spécifique d'AP, d'asperlactone et d'isoasperlactone est supérieure avec l'acide glutamique dans nos résultats et inférieure avec la phénylalanine.

Dans nos résultats, la production spécifique d'AP, d'asperlactone et d'isoasperlactone, dans le milieu contenant l'acide glutamique, est plus optimale que celle dans le milieu contenant NH_4Cl et NH_4NO_3 . Ce qui est en accord avec ceux d'Untrau *et al.* (1994) qui ont rapporté que ces ions ammonium exercent un effet négatif sur les activités de protéase qu'ils libèrent des précurseurs des acides aminés. Concomitamment, la production de la spiramycine était plus élevée sur la lysine que sur l'ammonium. Ils coïncident également avec les autres résultats comme ceux de (Szakacs *et al.*, 1998; Manzoni *et al.*, 1999) qui rapportent que les sources d'azote organiques telles que l'acide glutamique ont favorisé la production de lovastatine (forme lactonique). D'autre part, la production spécifique d'ADHP est induite par NH_4Cl plus d'autres sources d'azote étudiées. Ceci également est en accord avec d'autres rapports qui ont montré que l'addition d'ammonium au milieu de la culture augmente la production de ces métabolites secondaires, telles que la stryptomycine, la néomycine et la gentamicine par sa conversion à la glutamine qui est utilisé dans la formation de précurseurs (Gonzalez *et al.*, 1995).

Compte tenu de ces résultats, les productions des composés lactoniques étudiées étaient optimales en présence des dextrines et de l'acide glutamique avec des taux de croissance relativement inférieurs ($0,019 \text{ h}^{-1}$ et $0,011 \text{ h}^{-1}$ respectivement) lorsqu'ils sont utilisés séparément comme uniques sources de carbone et d'azote respectivement. Ces résultats sont en accord avec les conclusions de Hajjaj *et al.* (2001) qui ont rapporté qu'une production spécifique relativement basse de la lovastatine a été obtenue dans les cultures qui se développent un taux spécifique de croissance élevé alors qu'une production plus élevée a été trouvée pour des taux de croissance inférieurs.

CHAPITRE III

**Influence des sources de carbone et d'azote sur la
production de deux composés herbicides (la melleine et le
4-hydroxymelleine) chez un mutant d'*Aspergillus
ochraceus* et la souche sauvage**

I. INTRODUCTION

Les champignons ont la capacité de produire une très grande diversité des métabolites secondaires qui sont dérivés d'une chaîne de poly- β -ketométhylène. Cette chaîne est formée par la condensation d'une ou plusieurs unités d'acétyle avec des unités de malonyle ou de méthyle malonique. La production et la surproduction des métabolites secondaires sont clairement devenu un secteur important de la biotechnologie. Elles intègrent ainsi les champs de recherche des sciences fondamentales et suscitent de nombreuses questions d'intérêt considérable aux scientifiques.

Les composés d'isocoumarine, la melleine (3,4-dihydro-8-hydroxy-3-methylisocoumarine) et le 4-Hydroxymelleine (3,4-dihydro-4,8-dihydroxy-3-methylisocoumarine) (Fig. 42) ont été isolées des milieux de culture d'*Aspergillus oniki* et d'*Aspergillus ochraceus* (Sasaki *et al.*, 1970; Cole *et al.*, 1971). Leur structure est semblable à la partie de la dihydroisocoumarine d'ochratoxine A (Van der Merwe *et al.*, 1965; Stadler *et al.*, 1995). Harris et Mantle (2001) ont rapporté que probablement la polykétide synthase intervenant dans la biosynthèse de l'OTA intervient également dans celle de la melleine et l'hydroxymelleine.

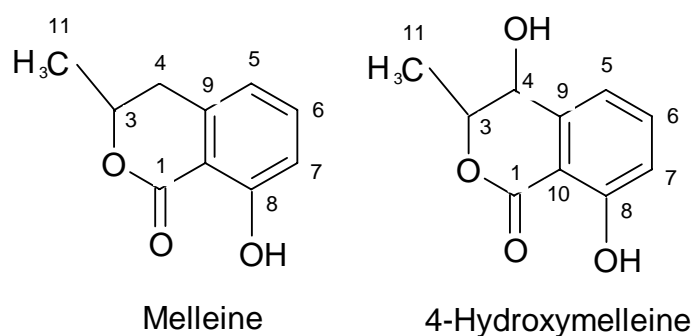


Fig. 42. Les structures chimiques de melleine et de 4-Hydroxymelleine

La melleine et ses dérivés phytotoxiques sont produits par plusieurs espèces fongiques, connues comme des contaminants ou des pathogènes importants des récoltes agricoles (Cole et Cox, 1981; Turner et Aldridge, 1983; Devys *et al.*, 1992; Krohn *et al.*, 1997; Kokubun *et al.*, 2003), tels que *Aspergillus ochraceus* (Yabuta et Sumiki, 1933), *Aspergillus mellus* (Nishikawa, 1933a, b), *Pezicula* spp. (Schulz *et al.*, 1995), *Botryosphaeria obtusa* (Venkatasubbaiah *et al.*, 1991), *Septoria nodorum* (Keller *et al.*, 1994), *Phoma tracheiphila* (Parisi *et al.*, 1993), *Apiospora camptospora* (Turner et Aldridge, 1983), *Cercospora taiwanensis* (Camarda *et al.*, 1976), *C. scirpicola* (Assante *et al.*, 1977), *Fusarium larvarum*

(Bosquet et Pople, 1979), *Gyrostroma missouriense* (Turner et Aldridge, 1983), *Pezicula livida*, *Cryptosporiopsis malicorticis*, *Cryptosporiopsis* sp. et *Plectophomella* sp. (Krohn *et al.*, 1997). Des traces de melleine ont été trouvées dans les extraits de *Cornitermes ramulorum* (Bestmann *et al.*, 1992). La melleine a également été identifiée dans les extraits de la *Cornitermes termite* (Termitidae) (Blum *et al.*, 1982); les sécrétions anales de *Haplothrips leucanthemi* (Blum *et al.*, 1992); et dans les sécrétions de papillons du fruit (Baker *et al.*, 1981).

Les pentakétides du type-melleine ((R)-melleine, (3R,4S)-hydroxymelleine, (3R,4R)-hydroxymelleine, (3R)-6-méthoxymelleine et (3R)-6-méthoxy-7-chloromelleine) et les composés apparentés comme le 4,8- dihydroxy-3,4- dihydro-2H-naphthalèn-1-one et le cryptosporiopsinole sont des métabolites fongiques connus, la plupart d'entre eux possèdent une activité biologique (d'une manière prédominante antimicrobienne).

Les composés d'isocoumarine comme la melleine peuvent être utilisés comme des inhibiteurs de l'HIV protéase. L'inactivation des protéases par des noyaux d'isocoumarine paraît résulter d'une attaque nucléophile entre le groupement carbonyle de l'isocoumarine et la serine ou la cystéine des sites enzymatiques (Bihel *et al.*, 2003). La melleine possède en plus une activité antifongique (Dai *et al.*, 2001). Ajouté à cela, les isocoumarines pourraient être utilisés comme des précurseurs pour la biosynthèse de certains métabolites secondaires tel que la canescine, un métabolite d'*Aspergillus malignus* (Staunton et Sunter, 1988). La melleine et la 4-hydroxymelleine possèdent également des activités herbicides. Ils sont très actifs contre le melaleuca et le sorghum (Hoult et Paya, 1996).

À l'exception de l'effets de la melleine sur les plantes, sur les larves de l'*Artemia saline* (Parisi *et al.*, 1993) ou sur les souris (Sasaki *et al.*, 1970), aucune donnée n'est disponible *in vivo* et *in vitro* sur les effets toxiques de melleine. Le DL₅₀ de melleine et de 4-hydroxymelleine injectés chez le souris par voie intraveineuse était de 250 à 500 et de 1000 à 1500 mg/kg, respectivement (Sasaki *et al.*, 1970).

La nature et la concentration des sources du carbone et de l'azote jouent un rôle important dans la régulation de plusieurs métabolites secondaires dans un milieu de culture.

Dans cette étude, nous avons isolé un mutant *A. ochraceus* M6 -fortement producteur de melleine et de 4-hydroxymelleine- suite à l'exposition d'*A. ochraceus* NRRL 3174 aux rayons UV. Nous avons comparé les productions de ces métabolites chez le mutant *A. ochraceus* M6 et chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 en présence de différentes sources de carbone et d'azote.

II. LES RÉSULTATS

II.1. Isolement et purification de melleine et de 4-hydroxymelleine

Dans le cadre de cette étude deux mutants (OTA⁻) ont été utilisés. *A. ochraceus* M18, mutant producteur de plusieurs nouveaux métabolites, a servi pour confirmer la structure chimique de la melleine et de l'hydroxymelleine. *A. ochraceus* M6 mutant non producteur d'OTA et accumulant des quantités de melleine et d'hydroxymelleine plus importantes que chez le sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (Fig. 43) a servi avec la souche parentale dans le cadre d'une étude comparative de l'effet des sources d'azote et de carbone sur la production de la melleine et du 4-Hydroxymelleine.

La melleine et le 4-hydroxymelleine ont été isolés et purifiés à partir de cultures d'*A. ochraceus* M18. L'application de l'extrait brut de ce mutant sur le gel de silice (CCM) a révélé 7 bandes fluorescentes principales qui ont les mobilités relatives (R_f) de 0,33, 0,44, 0,5, 0,55, 0,58, 0,63 et 0,84. La melleine et le 4-hydroxymelleine ont été obtenus à la suite d'analyse de la bande de R_f , 0,84 et de R_f , 0,55 respectivement par CLHP. La melleine est purifiée presque totalement uniquement par l'étape CCM.

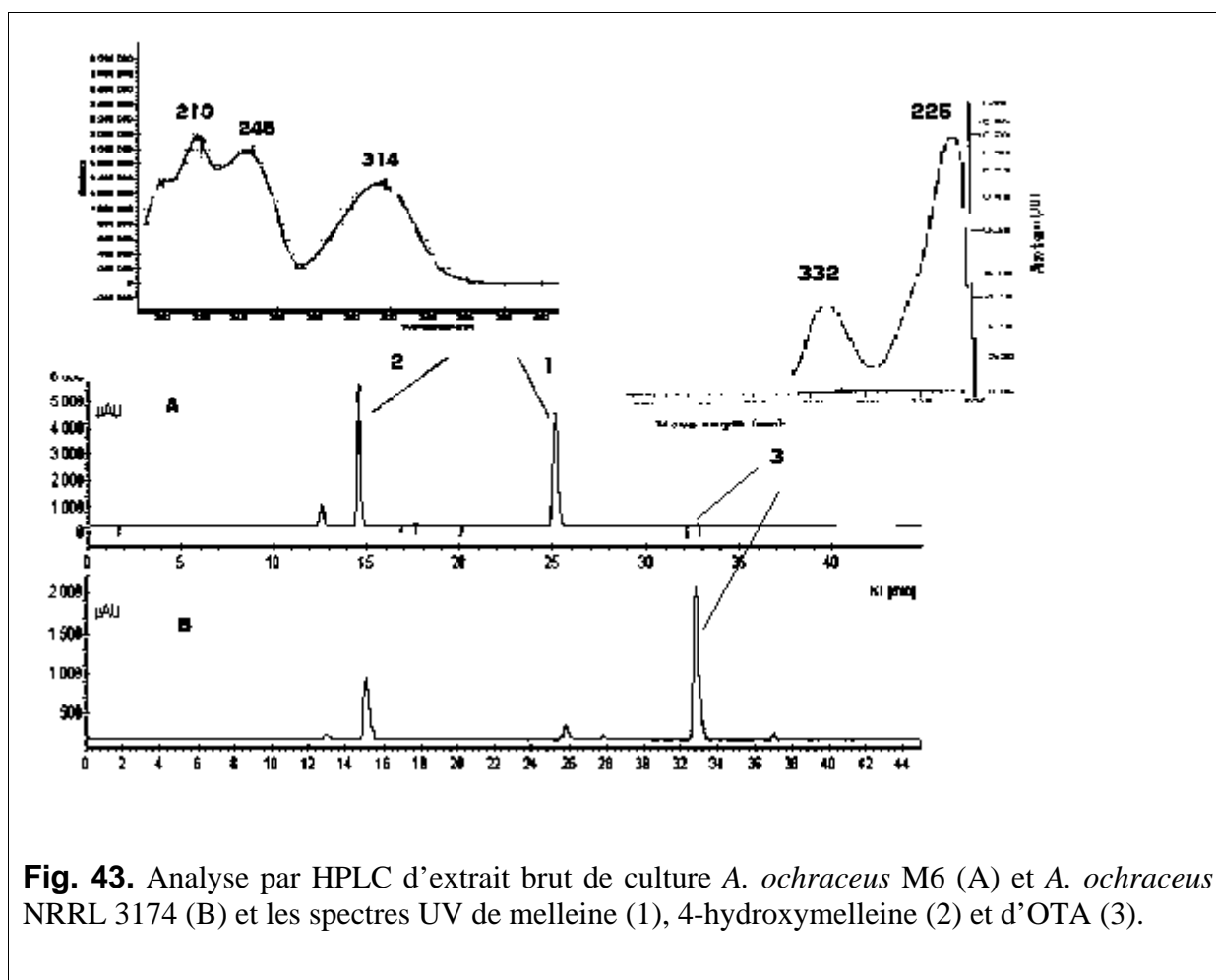


Fig. 43. Analyse par HPLC d'extrait brut de culture *A. ochraceus* M6 (A) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (B) et les spectres UV de melleine (1), 4-hydroxymelleine (2) et d'OTA (3).

II.2. La détermination des structures de melleine et de 4-hydroxymelleine

Les formules moléculaires de melleine et de 4-hydroxymelleine, $C_{10}H_{10}O_3$ et $C_{10}H_{10}O_4$ respectivement, ont été déterminées par nano-electrospray ESI/MS, spectre UV – Visible, 1H RMN et ^{13}C RMN. L'ensemble des résultats physico-chimiques obtenus suite à cette étude est résumé dans le tableau 14. La comparaison de ces données à ceux de la littérature fait sortir que les deux produits purifiés sont la melleine et le 4-hydroxymelleine.

Tableau 14

Les caractéristiques physico - chimiques de melleine et de 4-hydroxymelleine.

| Propriétés | Melleine | 4-Hydroxymelleine |
|--|---|--|
| L'apparence | cristal | cristal |
| Point de fusion | 51,5 – 52 ° | 123 – 124 ° |
| La formule moléculaire | $C_{10}H_{10}O_3$ | $C_{10}H_{10}O_4$ |
| Le poids moléculaire | 178 | 194 |
| La solubilité | Sol. MeOH, $CHCl_3$, bases; faible sol. H_2O ; très faible sol. hexane. | Sol. MeOH, $CHCl_3$ |
| UV λ_{max} nm (Méthanol) | 210, 245, 314. | 210, 245, 314. |
| MS(nano-ESI/MS) m/z : | 179 (M+H) ⁺ , 164 (179-CH ₃) ⁺ , 136 (179- CH ₃ -CO) ⁺ | 195 (M+H) ⁺ , 179 (195-O) ⁺ , 151 (195-CO ₂) ⁺ |
| 1H RMN, 400 MHz en $CDCl_3$ (δ , multi., J) | 4,77 (1H, multiplet, J = 1,39 Hz, H-3); 1,56 (3H, d, J = 11,03 Hz, H-11); 2,96 (2H, d, J = 4,73 Hz, H-4); 6,71 (1H, d, J = 2,13 Hz, H-5); 7,44 (1H, t, J = 2,20 Hz, H-6); 6,91 (1H, d, J = 2,26 Hz, H-7) & 11,06 (1H, br s, OH, H-8). | 4,64 (1H, m, J = 2,57 Hz, H-3); 1,56 (3H, t, J = 10,35 Hz, H-11); 4,65 (1H, m, J = 4,19 Hz, H-4); 7,05 (1H, q, J = 2,10 Hz, H-5); 7,58 (1H, t, J = 3,16 Hz, H-6); 7,03 (1H, t, J = 3,38 Hz, H-7); 2,22 (1H, br s, OH, H-4) & 11,06 (1H, br s, OH, H-8). |
| ^{13}C RMN, 100 MHz en $CDCl_3$ (δ) | 170,4 (C-1); 76,5 (C-3); 21,2 (C-11); 35,1 (C-4); 118,3 (C-5); 136,6 (C-6); 116,7 (C-7); 162,6 (C-8); 139,8 (C-9) & 108,7 (C-10). | 168,9 (C-1); 80,3 (C-3); 18,4 (C-11); 69,6 (C-4); 116,6 (C-5); 137,4 (C-6); 118,3 (C-7); 162,0 (C-8); 141,3 (C-9) & 107,0 (C-10). |

II.3. Etude comparative de production de la melleine et du 4-hydroxymelleine chez le mutant *A. ochraceus* M6 et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174

II.3.1. Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine chez le mutant *A. ochraceus* M6 et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174

Nous avons entrepris de vérifier le niveau de production de la melleine et du 4-hydroxymelleine, chez les deux souches, en présence de différentes sources de carbone. Dans ce cadre différentes cultures ont été menées en présence de glucose, fructose, saccharose, amidon, dextrine et de glycérol. Le tableau 15 présente les poids secs (PS_{\max}), le taux spécifique de croissance (μ_{\max}), la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine.

Tableau 15

Effet de différentes sources de carbone sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et de 4-hydroxymelleine chez *A. ochraceus* M6 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| C source | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS_{\max} (g l ⁻¹) | <i>A. ochraceus</i> M6 | | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | | | |
|------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------|------------------------------------|-------------------------------------|---|-----------------|
| | | | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS_{\max} (g l ⁻¹) | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | mellein | HO- melleine | | | melleine | HO- melleine |
| Glucose | 0,020 | 22,55 | 100,7 | 41,9 | 0,035 | 22,29 | 48,2 | 44,5 |
| Fructose | 0,024 | 19,40 | 20,4 | 51,3 | 0,035 | 23,44 | 4,5 | 27,9 |
| Saccharose | 0,020 | 24,14 | 215,27 | 58,5 | 0,023 | 36,23 | 241,0 | 74,4 |
| Amidon | 0,016 | 14,70 | 286,1 | 93,1 | 0,014 | 22,59 | 165,3 | 34,6 |
| Dextrine | 0,050 | 8,83 | 491,63 | 83,5 | 0,037 | 11,37 | 315,7 | 102,2 |
| Glycérol | 0,013 | 15,55 | 0 | 0,02 | 0,013 | 12,99 | 3,0 | 8,8 |

D'une façon générale, la mutation n'a pas fondamentalement affecté la croissance du mutant. On constate que quelque soit la source de carbone utilisée, les deux souches se développent presque à la même vitesse. Les variations observées peuvent être amplifiées par l'erreur commise quant à l'estimation de la biomasse et au non synchronisation des cultures.

Cependant, une différence assez importante est observée au niveau du rendement en biomasse en présence de saccharose et d'amidon. Cette différence est d'environ 33 %. Cette différence, supérieure à ce que les erreurs d'analyse provoquent, est sûrement due à une perturbation du métabolisme central ou d'hydrolyse de ces deux molécules provoquée par la mutation.

Comme dans le cas des autres métabolites étudiés, le glycérol reste toujours une mauvaise source de carbone malgré le bon rendement en biomasse. Les meilleures productions spécifiques sont obtenues en présence des polysaccharides (dextrines et amidon) suivies par le saccharose, le glucose et le fructose. D'une façon générale, le rendement en ces deux molécules est meilleur chez *A. ochraceus* M6; environ 1,5 à 4 fois supérieur à la souche parentale *A. ochraceus* NRRL 3174.

L'évolution cinétique de la production spécifique chez *A. ochraceus* M6 a montré qu'en présence de dextrines (Fig. 44), d'amidon (Fig. 45), de saccharose (Fig. 46) et de glucose (Fig. 47), la melleine apparaît après 5-7 jours d'incubation et la production spécifique maximale est obtenue après 9-13 jours d'incubation. Parmi ces 4 sources de carbone, seul le saccharose semble permettre presque la même production spécifique de melleine chez les deux souches. Il est difficile, à ce stade, de donner une explication à ce phénomène. En présence de ces 4 sources de carbone, la production de melleine et d'hydroxymelleine est séquentielle. Ce type de comportement est, probablement, le résultat d'une transformation de la melleine en hydroxymelleine.

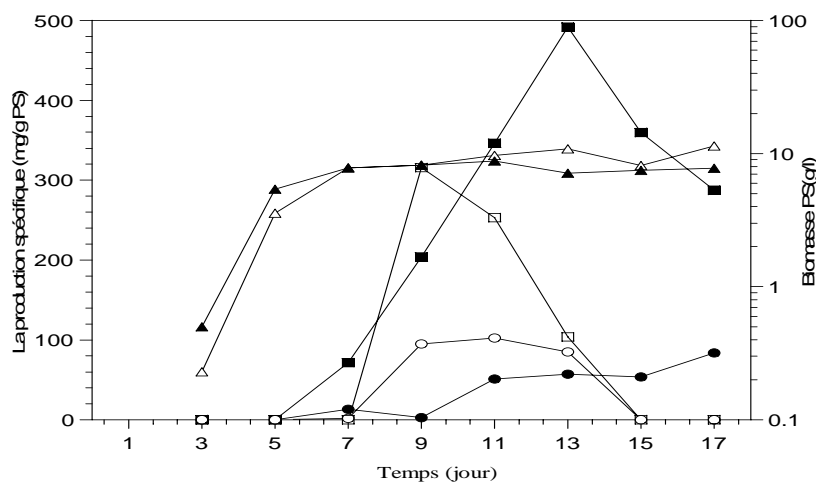


Fig. 44. Effet de dextrines comme unique source de carbone sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

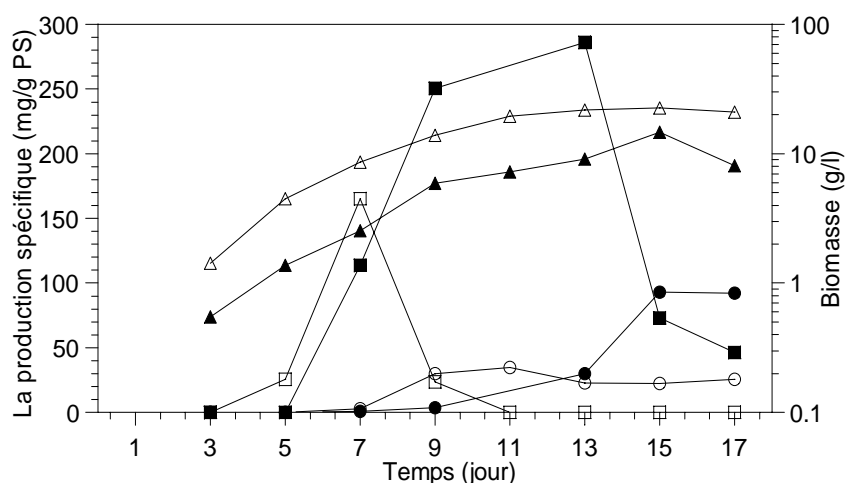


Fig. 45. Effet d'amidon comme unique source de carbone sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

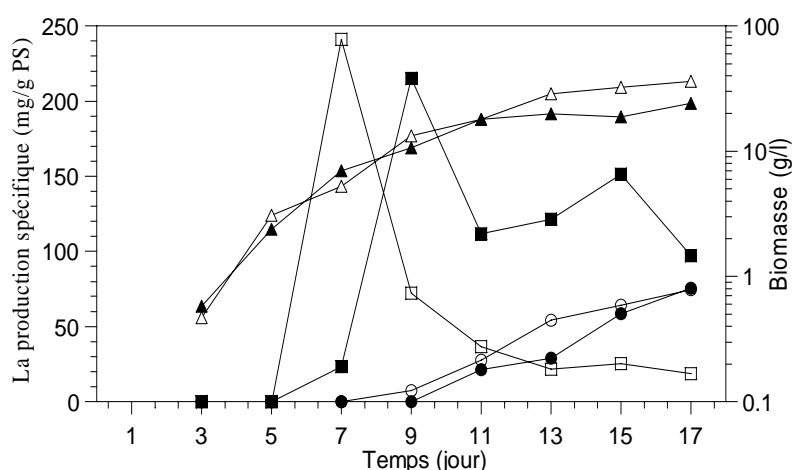


Fig. 46. Effet de saccharose comme unique source de carbone sur la croissance (\blacktriangle , \triangle) et sur la production spécifique de melleine (\blacksquare , \square) et de 4-hydroxymelleine (\bullet , \circ) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

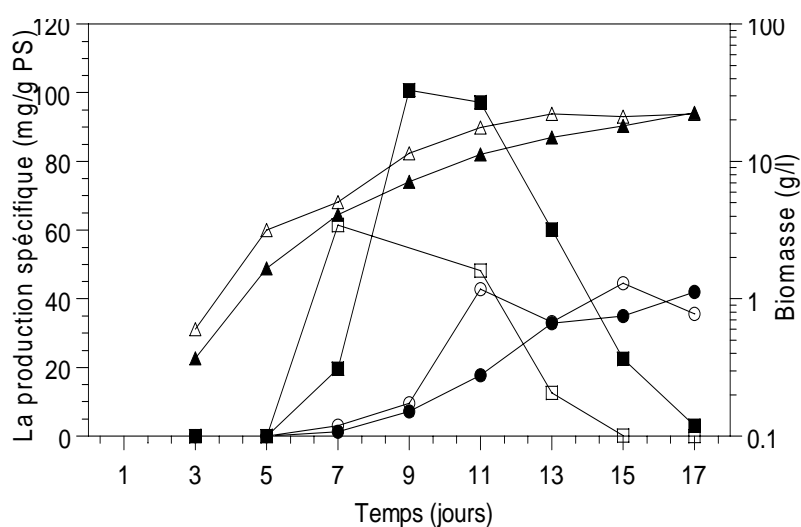


Fig. 47. Effet de glucose comme unique source de carbone sur la croissance (\blacktriangle , \triangle) et sur la production spécifique de melleine (\blacksquare , \square) et de 4-hydroxymelleine (\bullet , \circ) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

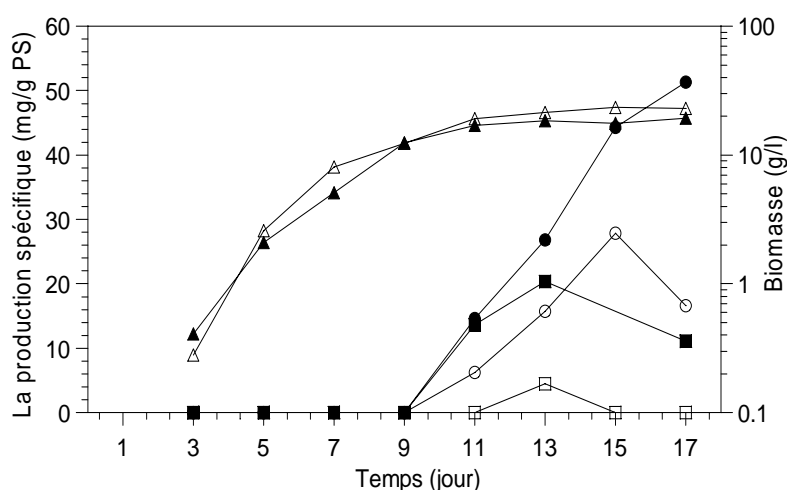


Fig. 48. Effet de fructose comme unique source de carbone sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

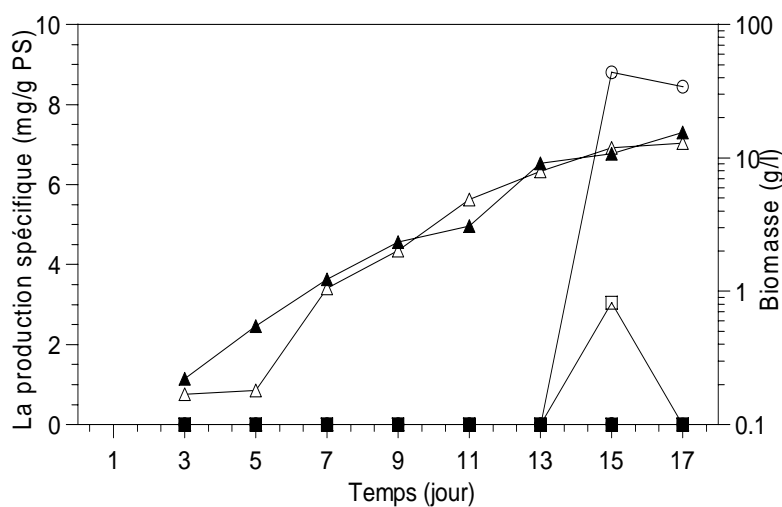


Fig. 49. Effet de glycérol comme unique source de carbone sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez le mutant *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

En présence du fructose et du glycérol (Figs. 48 et 49), la production reste très faible comparativement aux autres sources de carbone. La production de melleine et d'hydroxymelleine est tardive. Cette production démarre après 9 et 13 jours d'incubation en présence du fructose et du glycérol respectivement. La production spécifique maximale est obtenue à la fin de la culture (après 15-17 jours) chez les deux souches. Cette production est meilleure chez *A. ochraceus* M6 en présence du fructose. Ce pendant, le phénomène est inversé en présence du glycérol. La production est meilleure chez *A. ochraceus* NRRL 3174 que chez le mutant *A. ochraceus* M6.

II.3.2. Effet des différentes concentrations de glucose et de dextrines sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine

La souche mutante *A. ochraceus* M6 présente plusieurs avantages par rapport à *A. ochraceus* NRRL 3174. Elle ne produit pas l'OTA et produit la melleine avec un rendement 4 à 5 fois plus élevé. Cette souche a été retenue pour vérifier l'effet de la concentration du glucose et des dextrines sur la production des deux herbicides. Des concentrations de glucose ou de dextrine allant de 10 à 150 g/l ont été testées. L'ensemble des résultats est résumé dans le tableau 16.

Tableau 16

Effet des différentes concentrations de glucose et de dextrines sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine chez le mutant *A. ochraceus* M6

| C source | Conc. (g/l) | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g/l) | <i>A. ochraceus</i> M6 | |
|----------|----------------|------------------------------------|----------------------------|---------------------------------|-------------|
| | | | | Production spécifique (mg/g PS) | |
| | | | | melleine | HO-melleine |
| Glucose | 10 | 0,029 | 11,23 | 3,9 | 36,6 |
| | 25 | 0,026 | 17,50 | 216,7 | 44,1 |
| | 50 | 0,025 | 30,68 | 212,3 | 49,2 |
| | 100 | 0,024 | 27,49 | 74,0 | 41,9 |
| | 150 | 0,015 | 34,01 | 32,2 | 30,1 |
| Dextrine | 10 | 0,032 | 6,71 | 11,7 | 55,2 |
| | 25 | 0,030 | 9,56 | 143,4 | 63,9 |
| | 50 | 0,033 | 13,58 | 312,1 | 66,4 |
| | 100 | 0,034 | 11,73 | 710,0 | 109,4 |

Les résultats obtenus montrent clairement que l'augmentation de la concentration des dextrines n'a aucun effet sur la vitesse de croissance. Cette vitesse est d'environ 0,030 – 0,034 h⁻¹. Par contre, la biomasse maximale produite augmente jusqu'à 50 g/l de dextrine. Il semble que dans nos conditions de culture, les dextrines ne limitent plus la croissance microbienne à partir de 50 g/l. L'augmentation de la concentration en glucose de 10 à 100 g/l affecte très peu la vitesse spécifique de croissance. Cette vitesse est située à des valeurs entre 0,024 et 0,029 h⁻¹. Seule la concentration 150 g/l de glucose semble affecter négativement cette vitesse de croissance. Dans le cas du glucose, la biomasse maximale augmente à mesure que la concentration en glucose augmente jusqu'à environ 50 g/l. Au-delà de cette concentration, la biomasse produite reste relativement constante. Dans le cas du glucose, il semble également que 50 g/l est la concentration à partir de la quelle la croissance n'est plus limitée.

La production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine augmente avec la concentration de dextrine. Cette augmentation est de 96 % lorsque la concentration en dextrine passe de 10 à 50 g/l, alors qu'elle est de 56 % lorsque la concentration de dextrine passe de 50 à 100 g/l dans le cas de la melleine. La production de l'hydroxymelleine est également stimulée ce pendant avec une faible amplitude de 16 % et 39 % respectivement lorsque la concentration en dextrans passe de 10 à 50 g/l et de 50 à 100 g/l (Tableau 16).

Par contre, l'augmentation de la concentration en glucose jusqu'à 50 g/l stimule la production en melleine et hydroxymelleine (98 % et 26 %). Cependant, lorsque la concentration en glucose passe de 50 à 150 g/l, on constate une chute assez importante de la production. Cette chute est de 95 % et 39 % dans le cas de la melleine et de l'hydroxymelleine respectivement (Tableau 16).

L'augmentation de la concentration en glucose n'affecte pas le démarrage de production de la melleine et de l'hydroxymelleine (Fig. 51). Par contre, nous observons un ralentissement important de la vitesse de cette production à mesure que la concentration en glucose augmente. Ceci est particulier important dans le cas de l'hydroxymelleine où ce ralentissement abouti à une production continue jusqu'à 17 jours de fermentation. Ce phénomène est très peu observé dans le cas des dextrans (Fig. 50). La seule exception à ce comportement est la production en présence de 10 g/l de glucose ou de dextrans, concentration à laquelle la culture est fortement limitée en carbone et en énergie.

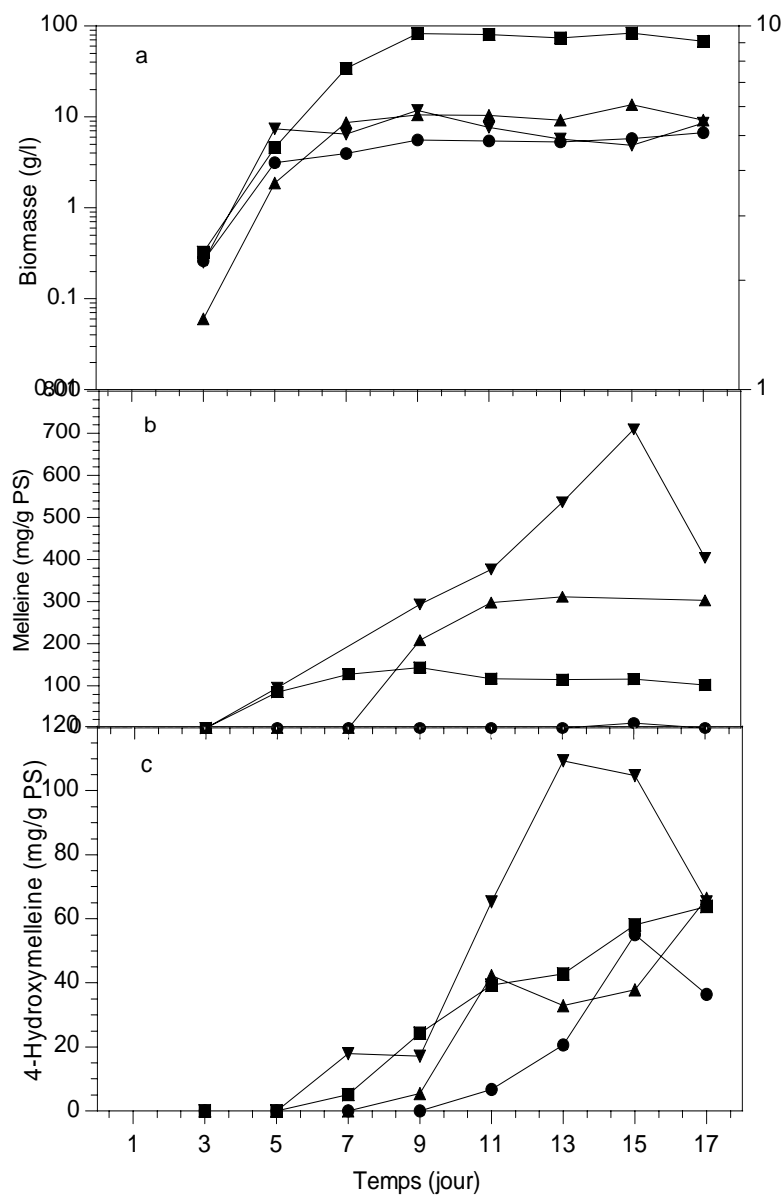


Fig. 50. Effet de différentes concentrations des dextrines [10 (●), 25 (■), 50 (▲) et 100 (▼) g/l] sur la croissance (a), et sur la production spécifique de melleine (b) et d'hydroxymelleine (c) chez le mutant *A. ochraceus* M6 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

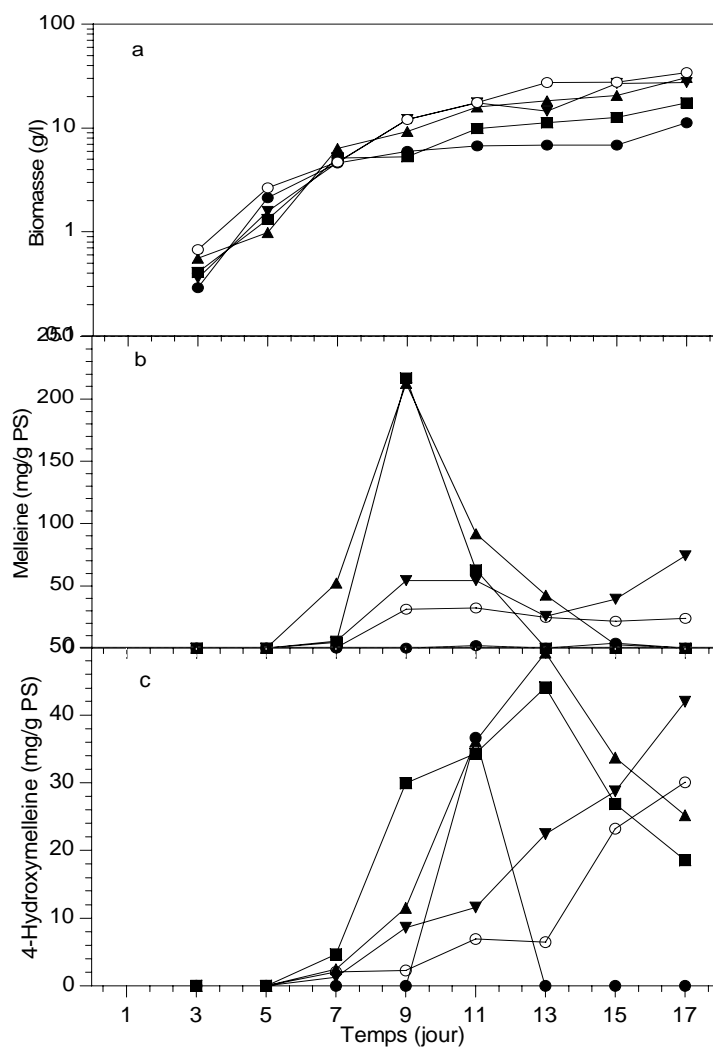


Fig. 51. Effet de différentes concentrations de glucose [10 (●), 25 (■), 50 (▲), 100 (▼) et 150 (○) g/l] sur la croissance (a), et sur la production spécifique de melleine (b) et d'hydroxymelleine (c) chez le mutant *A. ochraceus* M6 dans le milieu de culture contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

II.3.3. Cinétique de production de melleine et d'hydroxymelleine chez *A. ochraceus* M6 en présence de 50 g/l de dextrines et de glucose

Le glucose et les dextrines permettent des niveaux de production de melleine et d'hydroxymelleine différents. Cette différence peut être due à des phénomènes de répression catabolique lorsque les sources de carbone sont en excès. Elle peut être également dû à une fuite de carbone vers d'autres métabolites. C'est pour cette raison que nous avons choisi d'analyser davantage deux cultures réalisées sur 50 g/l de glucose et 50 g/l de dextrines, une concentration non limitante pour la croissance.

Quelque soit la source de carbone utilisée, une production séquentielle est toujours observée. La melleine est produite après 7 jours d'incubation au cours de la phase de croissance. Cette production continue après arrêt de la croissance et atteint une valeur maximale après 9-13 jours d'incubation. Après cette période, la quantité de melleine chute jusqu'à 17 jours d'incubation. Cette chute de melleine est associée à la production d'hydroxymelleine. La disparition de la melleine est totale en présence de glucose permettant un rendement final en hydroxymelleine d'environ 46 mg/g PS alors qu'en présence de dextrines, la disparition de melleine n'est que de 35 % permettant une production plus élevée en hydroxymelleine (56 mg/g PS).

Pendant la phase exponentielle, on note que la vitesse de consommation de glucose ($0,005 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ PS}$) est plus rapide que celle de dextrines ($0,003 \text{ g.h}^{-1}.\text{g}^{-1} \text{ PS}$). La concentration initiale de glucose de 50 g/l, est limitante pour la croissance puisque celle-ci s'arrête vers le 15^{ème} jour de la culture; alors que celle des dextrines est légèrement en excès à la fin de la culture (3,43 g/l).

Pendant la fermentation, la consommation de glucose est accompagnée par une augmentation de la concentration d'acides organiques. Dans le cas des deux cultures l'acide acétique est fortement produit (15 g/l) au cours de la phase de croissance. Ceci pourrait être expliqué par une saturation du cycle de Krebs par limitation d'oxygène aboutissant ainsi à une forte excrétion de l'acétyl-CoA sous forme d'acide acétique. La différence la plus importante entre les deux sources de carbone étudiées réside dans le fait que la quantité d'acide citrique excrété en présence du glucose (8,61 g/l) (Fig. 52) est plus élevée qu'en présence de dextrines (1,29 g/l) (Fig. 53).

Y'a-t-il une relation entre l'excrétion de ces acides dans le milieu de culture et la capacité du microorganismes à produire la melleine et l'hydroxymelleine ?. Des études complémentaires doivent être menés pour répondre à cette question.

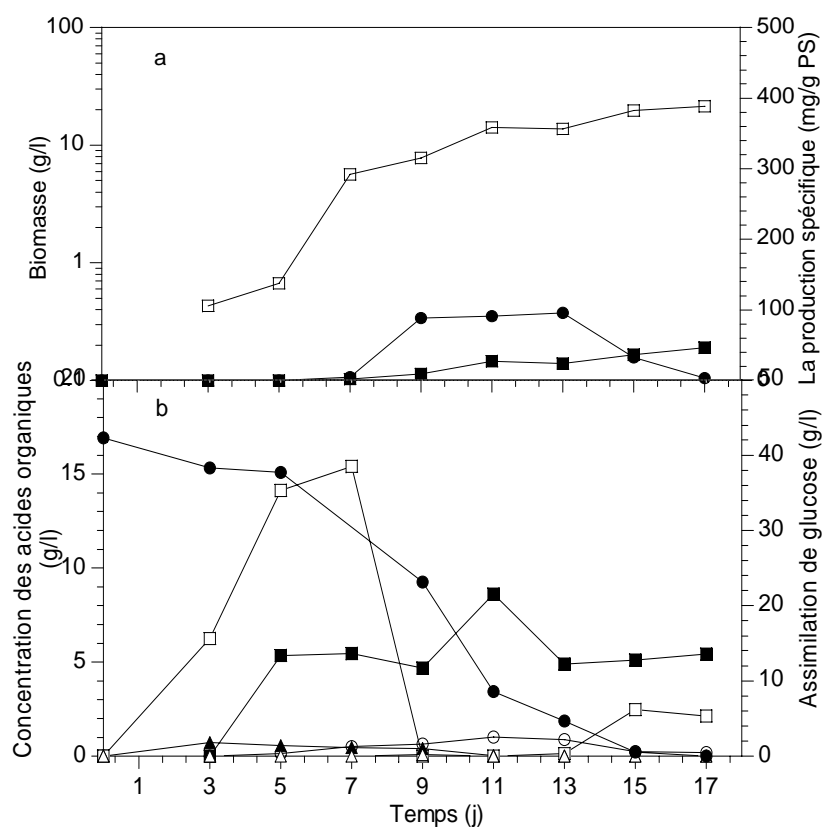


Fig. 52. Effet de glucose sur la production spécifique de melleine (●), de 4-Hydroxymelleine (■) et sur la biomasse (□) [a] et la relation entre l'assimilation de glucose et les acides organiques (en g/l); succinique (○), citrique (■), acétique (□), oxalique (▲) et malique (Δ) [b], produits pendant la fermentation d'*A. ochraceus* M6 dans le milieu synthétique liquide contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

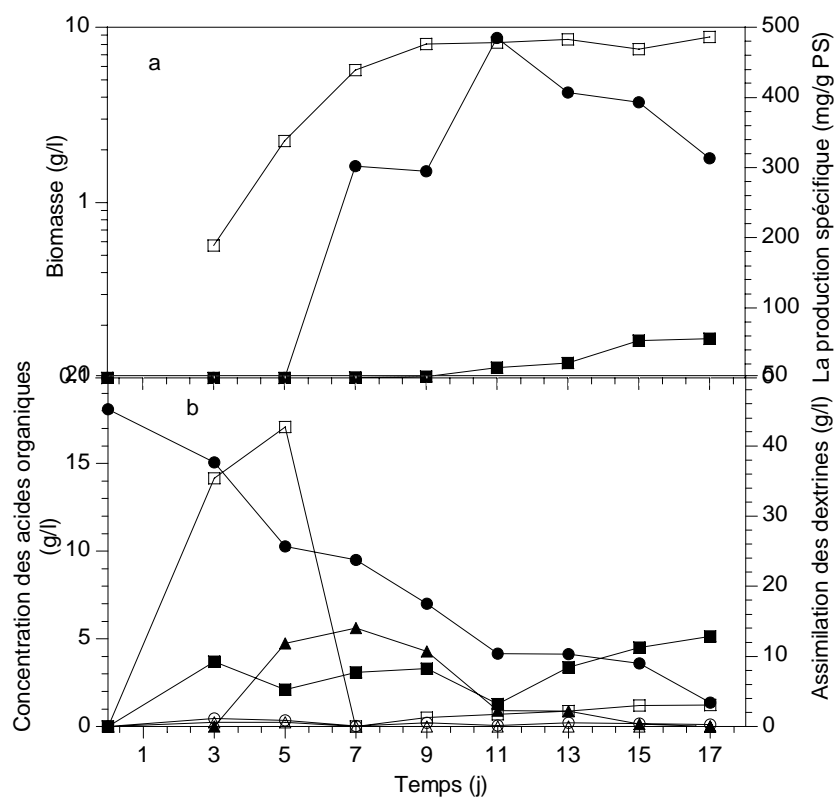


Fig. 53. Effet de dextrans sur la production spécifique de melleine (●), de 4-Hydroxymelleine (■) et sur la biomasse (□) (a) et la relation entre l'assimilation de dextrans et les acides organiques (en g/l); succinique (○), citrique (■), acétique (□), oxalique (▲) et malique (Δ) (b), produits pendant la fermentation d'*A. ochraceus* M6 dans le milieu synthétique liquide contenant NH_4NO_3 (3 g/l) comme unique source d'azote.

II.3.4. Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et la production spécifique de melleine et d'hydroxymelleine chez *A. ochraceus* M6 et *A. ochraceus* NRRL 3174

Sept sources d'azote, quatre organiques (acide glutamique, lysine-HCl, alanine et phénylalanine) et trois inorganiques (NaNO_3 , NH_4Cl et NH_4NO_3) ont été testées comme uniques sources d'azote pour la production de melleine et d'hydroxymelleine par *A. ochraceus* M6 et *A. ochraceus* NRRL 3174 dans le milieu synthétique contenant 50 g/l du glucose comme unique source du carbone. L'essentiel des résultats sont résumés dans le tableau 17.

Tableau 17

Effet de différentes sources d'azote sur la croissance et sur la production spécifique de melleine et de 4-hydroxymelleine chez *A. ochraceus* M6 et *A. ochraceus* NRRL 3174.

| N source | <i>A. ochraceus</i> M6 | | | | <i>A. ochraceus</i> NRRL 3174 | | | |
|--------------------------|------------------------------------|---|---|----------------|------------------------------------|---|---|----------------|
| | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | | μ_{\max} (h ⁻¹) | PS _{max} (g l ⁻¹) | Production spécifique (mg g ⁻¹ PS) | |
| | | | Mellein | HO- mellein | | | Mellein | HO- mellein |
| Acide glutamique | 0,013 | 14,98 | 304,91 | 38,75 | 0,017 | 16,49 | 92,55 | 14,28 |
| Lysine.HCl | 0,024 | 31,45 | 67,59 | 2,51 | 0,023 | 20,42 | 0,63 | 10,99 |
| Alanine | 0,013 | 15,16 | 141,17 | 35,18 | 0,032 | 19,37 | 50,07 | 27,35 |
| Phénylalanine | 0,015 | 9,88 | 158,09 | 42,21 | 0,022 | 20,29 | 20,44 | 12,06 |
| NH_4NO_3 | 0,018 | 20,83 | 66,91 | 53,81 | 0,039 | 23,52 | 86,07 | 18,18 |
| NH_4Cl | 0,023 | 12,07 | 419,96 | 23,51 | 0,041 | 20,79 | 171,57 | 34,04 |
| NaNO_3 | 0,018 | 20,97 | 189,51 | 48,22 | 0,026 | 21,16 | 51,57 | 25,26 |

A. ochraceus NRRL 3174 se développe très bien sur NH_4Cl , NH_4NO_3 et alanine ($0,032\text{-}0,041\text{ h}^{-1}$). Les autres sources d'azote permettent une vitesse de croissance plus faible ($0,017\text{-}0,026\text{ h}^{-1}$). *A. ochraceus* M6, ayant subi une mutation, présente un comportement différent lorsque les sources d'azote utilisées sont le NH_4Cl , NH_4NO_3 et l'alanine. En effet, pour ces trois sources d'azote, la vitesse spécifique de croissance a chuté d'environ 50 à 60 %. La mutation chez *A. ochraceus* M6 touche probablement le métabolisme de l'ammonium et de l'alanine. Cet acide aminé est souvent assimilé via le cycle de Krebs après avoir libéré l'ammonium après une désamination.

La production de la biomasse dépend également de la nature de la source d'azote. Chez la souche parentale, le PS_{max} n'est pas fondamentalement différent. Il oscille entre 15 et 23 g/l selon la source d'azote utilisée. Par contre, là aussi le mutant présente un comportement différent. En effet, les PS_{max} obtenus en présence de la phénylalanine et du NH_4Cl ont chuté de 50 % et de 43 % respectivement, alors qu'en présence de lysine, on constate une augmentation de 35 % de PS_{max} .

Quelque soit la nature de la source d'azote utilisée, le rendement de production de melleine reste plus élevée chez *A. ochraceus* M6. Ce rendement est plus élevé d'environ 2-8 fois que chez la souche parentale *A. ochraceus* NRRL 3174, il augmente de 100 fois dans le cas de la lysine-HCl. Ce n'est pas le cas du rendement de production d'hydroxymelleine. En effet l'augmentation du rendement de l'hydroxymelleine reste plus modeste. Par contre, ce qui est particulier c'est que l'ammonium permet les meilleures productions spécifiques aussi bien chez le mutant que chez la souche parentale, suivi par l'acide glutamique. D'habitude l'ion ammonium exerce des répressions cataboliques sur la production des métabolites secondaires. Cependant cette répression catabolique dépend également de la concentration utilisée.

Le suivi de la cinétique de production de la biomasse, de la melleine, et de l'hydroxymelleine montre plusieurs aspects. D'abord une production séquentielle de melleine et d'hydroxymelleine est toujours présente à l'exception du cas de la lysine (Fig. 54). En suite le mutant semble produire la melleine d'une façon beaucoup plus précoce que dans le cas de la souche parentale. Cette production est carrément associée à la croissance dans le cas de l'alanine (Fig. 55), de l'acide glutamique (Fig. 56), du NaNO_3 (Fig. 57) et du NH_4NO_3 (Fig. 58). Ce pendant, elle est très tardive en présence de lysine. Le comportement cinétique en présence de phénylalanine (Fig. 59) et de NH_4Cl (Fig. 60) est différent. La production semble se faire particulière au cours de la phase stationnaire de croissance. Les sources d'azote, selon leurs voies de catabolisme, exercent des actions de régulation totalement différentes.

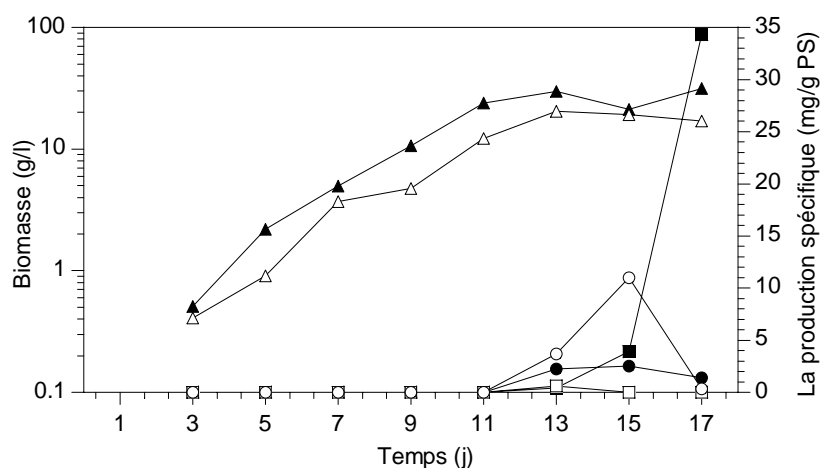


Fig. 54. Effet de lysine.HCl comme unique source d'azote sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

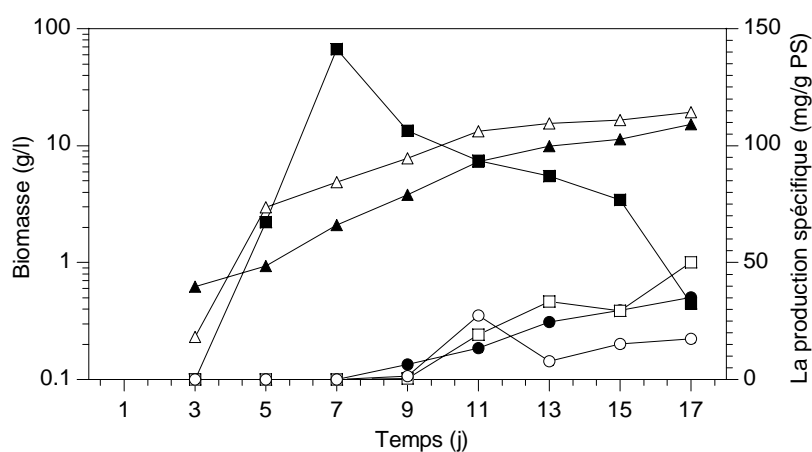


Fig. 55. Effet d'alanine comme unique source d'azote sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

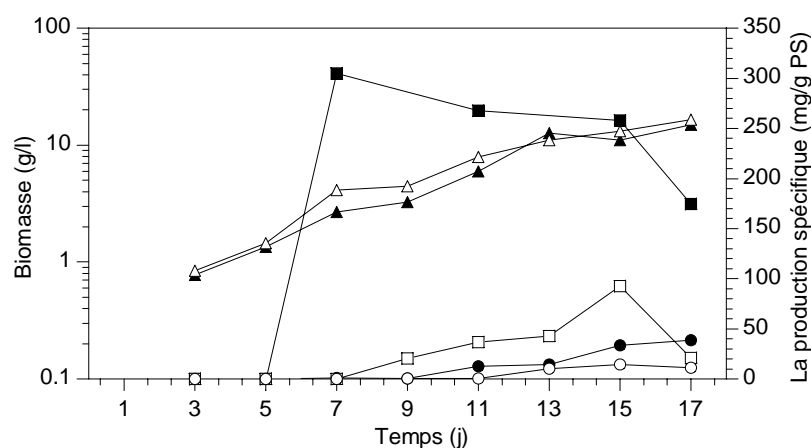


Fig. 56. Effet d'acide glutamique comme unique source d'azote sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

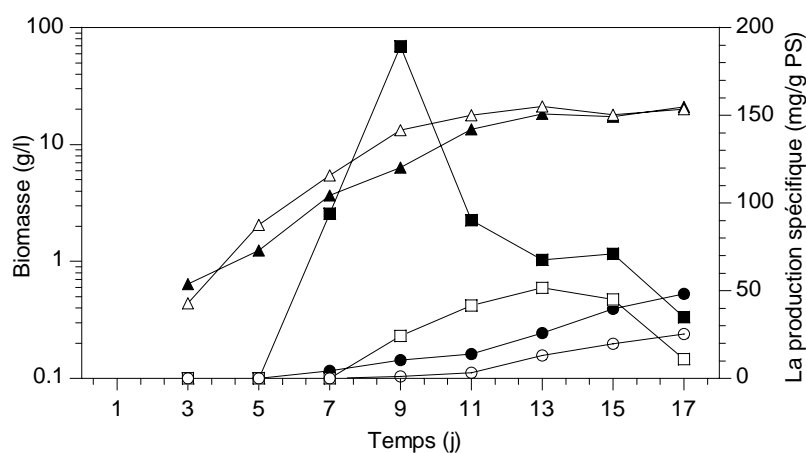


Fig. 57. Effet de NaNO_3 comme unique source d'azote sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

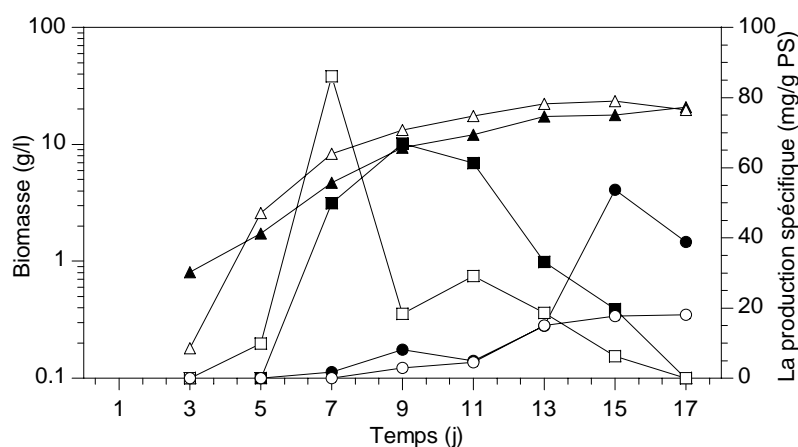


Fig. 58. Effet de NH_4NO_3 comme unique source d'azote sur la croissance (\blacktriangle , \triangle) et sur la production spécifique de melleine (\blacksquare , \square) et de 4-hydroxymelleine (\bullet , \circ) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

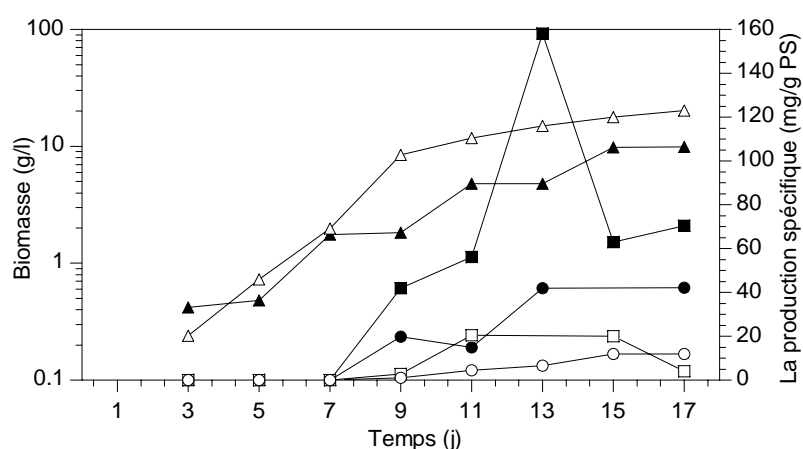


Fig. 59. Effet de phénylalanine comme unique source d'azote sur la croissance (\blacktriangle , \triangle) et sur la production spécifique de melleine (\blacksquare , \square) et de 4-hydroxymelleine (\bullet , \circ) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

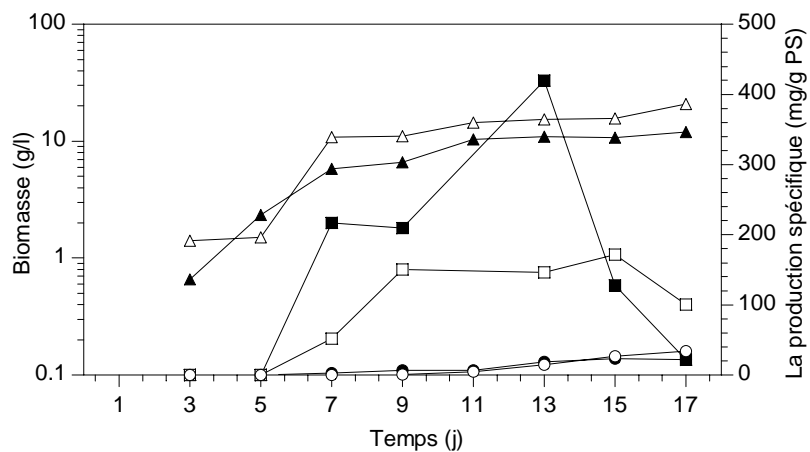


Fig. 60. Effet de NH_4Cl comme unique source d'azote sur la croissance (▲, △) et sur la production spécifique de melleine (■, □) et de 4-hydroxymelleine (●, ○) chez *A. ochraceus* M6 (symbole plein) et *A. ochraceus* NRRL 3174 (symbole vide) dans le milieu de culture contenant glucose (50 g/l) comme unique source de carbone.

III. DISCUSSION

La mutation d'*A. ochraceus* NRRL 3174 par rayons UV a permis d'améliorer les productions de melleine et d'hydroxymelleine par *A. ochraceus* M6. Ces productions se comportent différemment selon la composition chimique du milieu. La disparition de la melleine est simultanée à l'accumulation de l'hydroxymelleine. Des études ultérieures (mutation ou composition du milieu) pourront nous permettre des meilleures conditions de conservation de la melleine produite.

Dans les études présentes, nous avons remarqué que la production de melleine et d'hydroxymelleine est davantage optimale en présence des polysaccharides (les dextrines et l'amidon) qu'en présence des monosaccharides (le glucose et fructose) chez *A. ochraceus* M6, en comparaison de celle trouvée chez *A. ochraceus* NRRL 3174. Ces productions sont optimales en concentration de 100 g l⁻¹ de dextrines, tandis que elles sont défavorables en faible concentration (10 g l⁻¹) et en concentration élevée (150 g l⁻¹) de glucose.

La production spécifique élevée obtenue, lorsque les dextrines ou l'amidon ont été employés comme unique source de carbone, peut être due à l'hydrolyse lente des dextrines et de l'amidon produisant ainsi une situation de limitation carbonique et fournissant le milieu de culture par une forme régulière de source de carbone (Lam *et al.*., 1989). Le glucose a montré une production de la melleine inférieure aux deux polysaccharides. Ces observations reflètent la répression de métabolisme secondaire par le glucose, vraisemblablement dû à un taux inférieur d'assimilation du polymère ou à la lenteur catabolisme en monomères (Yang *et al.*, 2003).

L'addition de glucose en excès (100 g/l) au milieu synthétique montre que les productions de melleine et de 4-hydroxymelleine ont été réprimées. Plusieurs métabolites secondaires réprimés par le glucose ont été relatés dans la littérature. Il s'agit par exemple de la production de la pénicilline chez *Penicillium chrysogenum* (Revilla *et al.*, 1984), de la cephamycine chez *Streptomyces clavuligerus* (Aharonowitz et Demain, 1978). Ce pendant, d'autres études relatent quelques exemples où le glucose n'affectait pas fortement la biosynthèse de certains métabolites secondaires. Par exemple la production de FK-506 (un immunosuppresseur) n'a pas été considérablement affectée quand le glucose est en excès (Yoon et Choi, 1997).

La présence des sources de carbone en excès, par exemple le glucose, inhibe la synthèse des enzymes extracellulaires (Strauch et Hoch, 1993a), l'expression des enzymes de cycle de Krebs (Fouet *et al.*, 1990) et l'initiation de la sporulation (Takahashi et MacKenzie, 1981). De plus, dans quelques micro-organismes, l'effet inhibiteur du glucose est dû à l'acidification par la suite de l'accumulation d'acides organiques tels que les acides: lactique, acétique, citrique et pyruvique (Agrawal *et al.*, 1989; Regassa *et al.*, 1992; Shafikhani *et al.*, 2003). Par exemple, la production de la prodigiosine par *Serratia marcescens* a été inhibée quand le glucose est en excès (Solé *et al.*, 1997, 2000).

Sanchez et Demain (2002) ont rapporté qu'il y a beaucoup d'exemples des métabolites secondaires régulés par la source de carbone dans les bactéries et les champignons. Par exemple, dans le champignon filamenteux *A. chrysogenum*, la biosynthèse de l'antibiotique β -lactame cephalosporine C est réprimée par le glucose. Demain *et al.* (1989) décrivent bien 18 exemples de métabolites secondaires dont la production est réprimée par le glucose et 5 autres exemples de composés dans les quels la répression par d'autres sources de carbone; métabolites secondaires de bien connues sont produits par des microo-organismes prokaryotes et eukaryotes, la pénicilline, la cephalosporine, l'actinomycine, le chloramphenicol, la tetracycline, la kanamycine, la néomycine, les alcaloïdes de l'ergot etc. (Demain, 1982; Lebrihi *et al.*, 1988).

Dans nos résultats, la production de melleine était complètement inhibée, celle de 4-hydroxymelleine a été réprimée par la présence de glycérol comme unique source du carbone chez *A. ochraceus* M6. Ceci est en accord avec les résultats de Lebrihi *et al.* (1988) lesquels ont rapporté que le glycérol a réprimé la production de cephamycine C par la répression du système de cephamycin C synthétase. Les mêmes résultats ont été observés dans la production de FK-506 (immunosuppresseur) de *Streptomyces* sp. en présence de glycérol (Yoon et Choi, 1997).

Les micro-organismes sont capables d'utiliser une large variété de sources d'azote pour la croissance mais toutes les sources d'azote ne supportent pas également la croissance. En général, les meilleurs sources d'azote sont l'ammonium, le glutamine et le glutamate (Sanchez et Demain, 2002). Les productions spécifiques de melleine et de 4-hydroxymelleine par le mutant *A. ochraceus* M6 étaient les meilleures en présence des sources d'azote inorganiques (NH_4Cl) comparé aux sources d'azote organiques (acides aminés). Ceci est en accord avec les résultats de Wallace *et al.* (1990) lesquels ont rapporté que lorsque le chlorure d'ammonium

est utilisé comme seule source d'azote, la période de la production est étendue, et la production de la streptonigrine est augmentée. En outre, les productions de la streptomycine, de la néomycine et de la gentamicine ont été augmentées par l'addition d'ammonium au milieu de la culture (Okazaki *et al.*, 1973; Inoue *et al.*, 1983; Gonzalez *et al.*, 1995). La stimulation de la production de la gentamicine paraît être dû à la conversion de l'ion ammonium en glutamine. De la même façon, la production de l'acide usnique, un métabolite secondaire, par *Usnea hirta* était plus élevée dans le milieu liquide contenant les ions ammonium que dans celui qui contient les acides aminés (Kinoshita *et al.*, 2001).

Par contre, il y a évidence expérimentale pour la répression de la production d'antibiotique exercée par quelques sources d'azote et surtout l'ammonium (Aharonowitz, 1980; Brana et Demain, 1988). Cependant qu'il y avait plusieurs métabolites secondaires tel que la spiramycine produite par *Streptomyces amphotaciens* ont été réprimés par la présence des ions ammonium dans le milieu de culture (Untrau *et al.*, 1994). Le métabolisme d'azote affecte aussi la biosynthèse des mycotoxines et d'autres métabolites secondaires des champignons. Par exemple, la biosynthèse de la Gibberelline chez *Gibberella fujikuroi* montre la répression du métabolite d'azote (Munoz et Agosin, 1993) ainsi que la biosynthèse de l'Aflatoxine chez *Aspergillus flavus* et chez *A. parasiticus* est inhibée par des concentrations élevées d'ammonium nitrate dans le milieu de la croissance.

Parmi les acides aminés utilisés, l'acide glutamique était la meilleure source d'azote pour la production de melleine et d'hydroxymelleine chez *A. ochraceus* M6. Il a été rapporté que la production de la fumagilline par *A. fumigatus* était optimale en présence d'acide glutamique (Demain, 1986; Yang *et al.*, 2003). Moore *et al.* (1972) ont rapporté que l'acide glutamique à 6 g/l a produit les quantités maximales de melleine et de 4-hydroxymelleine chez *A. ochraceus*. Cette dernière observation était en accord aussi avec Searcy *et al.* (1969) lesquels ont rapporté que la source d'azote préférée pour la production d'ochratoxine A par *A. ochraceus* étaient l'acide glutamique. D'autre part, les autres acides aminés étudiés ont des effets répressifs sur la production de ces molécules. Shim et Woloshuk (1999) ont rapporté que il est possible que l'alanine et la méthionine aient aussi un effet répressif semblable sur le fumonisine B1.

L'addition de 37,5 mM de lysine au milieu de culture provoque l'induction de melleine de 67,59 mg/g PS chez *A. ochraceus* M6 par rapport à la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL

3174 (0,63 mg/g PS). Ces résultats sont en accord avec ceux de Lu *et al.* (1992) et Penalva *et al.* (1998) qui observent que peu d'informations sont connus au sujet de la mode d'action des composés qui agissent sur la production des métabolites secondaires dans les champignons. Parmi les peu d'exemples sont l'effet stimulateur des précurseurs comme l'acide aminoadipique et la lysine sur la biosynthèse de β -lactame chez *Penicillium* sp. ou *Aspergillus* sp.

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

CONCLUSION GENERALE ET PERSPECTIVES

Dans le cadre de cette étude, quatre axes de recherche ont été développés.

Dans un premier temps, une partie des travaux a consisté à opérer des mutations de la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 par son exposition aux UV (254 nm).

Dans un second temps, nous avons tenté, par des méthodes chromatographiques et spectroscopiques, la caractérisation des nouveaux métabolites secondaires.

La troisième grande partie a consisté à réguler la production de ces nouveaux métabolites, ainsi que d'autres métabolites déjà connus, par des sources de carbone et d'azote.

Enfin, la dernière grande partie du travail a consisté à améliorer la production du melleine et de l'hydroxymelleine chez le mutant *A. ochraceus* M6, deux composés herbicides qu'il les produit en grande quantité après la mutation.

- L'exposition d'*A. ochraceus* aux UV ($\lambda = 254$ nm) a permis d'obtenir plusieurs mutants importants (18 mutants), non producteurs d'OTA, ayant la capacité de produire plusieurs métabolites secondaires, dont certains sont nouveaux (composés **1**, **2**, **3** et **4**) et d'autres déjà connus (l'acide pénicillique, l'acide dihydropénicillique, l'asperlactone, l'isoasperlactone, la melleine et le 4-hydroxymelleine). Parmi ces mutants, deux mutants (M18 et M6) ont été étudiés. Dix métabolites secondaires ont été purifiés et caractérisés du milieu de la culture du mutant *A. ochraceus* M18.

- Les nouveaux métabolites secondaires ont été purifiés par le CCM et l'HPLC et leurs structures chimiques ont été déterminés par les méthodes spectroscopiques : UV, IR, MS et ^1H et ^{13}C RMN. Ces métabolites sont : le 2, 10-diméthyl 4-hydroxy-6-oxo-4-undécen-7-yne (**1**) et 4-(3-méthyl-2-butenyl) oxy 1-phényl acide acétique (**2**), le 4-Hydroxy-5,6-diisobutyl-5,6-époxy-pyrone (**3**) et le 3,13-Dihydro-6-hydroxy-3,13-diéthanol-8,11-diisobutyl-7,12-pyrano-isocoumarin (**4**).

- Les nouveaux métabolites possèdent des fortes activités antibiotiques (Anti- Gram + et Anti- Gram-). Le composé **1** avait un effet inhibiteur sur *B. subtilis* et *S. aureus* mais n'en avait pas sur les autres souches testées. Cependant, le composé **2** n'a pas montré d'effets sur toutes les souches qui ont été testées. De nouvelles études devront être conduites pour montrer si le composé **1** a un MIC (Concentration Inhibitrice Minimale) intéressant vis-à-vis de *S. aureus*

comparé aux antibiotiques connus. Les composés **3** et **4** ont montré des activités antimicrobiennes vis-à-vis des bactéries Gram +, *B. subtilis* mais aucun n'était actif contre les autres souches testées.

- La production du composé **1** a généralement été associée à la croissance alors que celle du composé **2** a été, au contraire, dissociée de la croissance. La biosynthèse de ces deux métabolites a été influencée par les sources de carbone et d'azote. La production spécifique du composé **1** était meilleure en présence des dextrines, du galactose et du saccharose alors que celle du composé **2** était en présence des dextrines seulement. Parmi toutes les sources d'azote qui ont été testées, seules la phénylalanine et l'acide glutamique ont permis de meilleures productions.

- Les productions des composés **3** et **4** ont été induites par les dextrines et l'amidon, et ont été réprimés par le galactose et le glycérol. De la même manière, la production de ces deux nouveaux métabolites a été affectée par les sources d'azote, et la production spécifique maximale a été observée davantage avec des sources d'azote organiques (acide glutamique) qu'avec les sources de l'azote inorganiques (NH_4NO_3).

- L'acide pénicillique (AP), l'acide dihydropénicillique (ADHP), l'asperlactone et l'isoasperlactone ont été isolés et caractérisés par le mutant *A. ochraceus* M18, et leurs productions ont été régulées par les sources de carbone et d'azote. Les polysaccharides (les dextrines et l'amidon) sont les sources optimales pour stimuler la production spécifique de ces métabolites.

- La production spécifique d'acide pénicillique et d'acide dihydropénicillique observée la plus élevée est de 122,48 mg/g PS et de 15,08 mg/g PS respectivement lorsque les dextrines étaient utilisées comme uniques sources de carbone chez le mutant *A. ochraceus* M18 comparé à 90,72 mg/g PS et 7,39 respectivement chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

- La production spécifique de l'acide pénicillique chez le mutant *A. ochraceus* M18 était favorisée en présence d'acide glutamique (63,28 mg/g PS) et en présence de NH_4Cl (51,81 mg/g PS), comparé à 29,23 mg/g PS en présence d'acide glutamique chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 parmi toutes les sources d'azote qui ont été testées. Nous avons

remarqué que la production spécifique de l'acide dihydropénicillique était la plus élevée, en présence de NH_4Cl (7,83 mg/g PS) chez *A. ochraceus* M18, et en présence de NH_4NO_3 (5,59 mg/g PS) chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

- La production spécifique d'asperlactone et d'isoasperlactone observée la plus élevée est de 216,08 mg/g PS et 127,83 mg/g PS respectivement chez le mutant *A. ochraceus* M18 comparé à 157,17 mg/g PS et 34,59 mg/g PS respectivement chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 en présence de dextrines.

- La production spécifique maximale d'asperlactone, en présence d'acide glutamique, était la plus élevée parmi toutes les sources d'azote étudiées chez le mutant *A. ochraceus* M18 et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174. Il a révélé une production spécifique maximale d'asperlactone et d'isoasperlactone (175,93 et 85,67 mg/g PS respectivement) chez le mutant *A. ochraceus* M18 alors qu'elle était de 71,83 mg/g PS et de 25,19 mg/g PS en présence d'acide glutamique et de NH_4NO_3 respectivement chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

- Par conséquent, la mutation par UV a résulté en une amélioration de la production d'acide pénicillique, d'acide dihydropénicillique, d'asperlactone et d'isoasperlactone chez le mutant *A. ochraceus* M18 comparé à celle produite par la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

- L'asperlactone a montré un effet inhibiteur significatif contre plusieurs types de microorganismes (*M. luteus*, *E. Coli*, *Mucor. r*, *S. cerevisiae* et *B. subtilis*) comparé à l'isoasperlactone (*B. subtilis* et *M. luteus*). La concentration inhibitrice minimale (CIM) d'asperlactone et d'isoasperlactone contre les micro-organismes testés a été trouvée avec une concentration de 200 µg/mL.

- Suite à la mutation, le mutant *A. ochraceus* M6 a révélé un niveau élevé de melleine et de 4-hydroxymelleine comparé à celui obtenu par la souche sauvage *A. ochraceus* (2 à 5 fois). Pour cette raison, nous avons concentré notre travail sur l'étude du mutant *A. ochraceus* M6 afin d'améliorer les productions de ces métabolites (melleine et 4-Hydroxymelleine) d'autant qu'ils deviennent des composés herbicides très importants dans la biotechnologie.

- La production dépend de la nature et de la concentration de la source de carbone tandis que la production de melleine et de HO-melleine est optimale avec 100 g/l de dextrines et qu'elle était défavorable avec 10 g/l et 150 g/l de glucose.

- La production de melleine et de 4-hydroxymelleine ont été contrôlées par les sources de carbone et d'azote. Elles ont été induites, par ordre décroissant, par les polysaccharides (dextrines et amidon), les disaccharides et les monosaccharides. Leurs productions spécifiques étaient optimales avec les dextrines (709,8 et 109,4 mg/g PS, respectivement) à des concentrations élevées (100 g/L) mais ont été réprimées par le glucose à des concentrations inférieures (10 g/L) (3,9 et 36,6 mg/g PS, respectivement) et plus élevées (150 g/L) (32,2 et 30,1 mg/g PS, respectivement). De plus, ces productions spécifiques ont été affectées par les sources d'azote ; les productions maximales ont davantage été atteintes avec les sources inorganiques qu'avec les sources d'azote organiques chez le mutant *A. ochraceus* M6 et la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

-De plus, parmi les sources d'azote qui ont été testées pour la production spécifique d'hydroxymelleine par le mutant *A. ochraceus* M6, le NH_4NO_3 (53,81 mg/g PS) était la meilleure source d'azote comparé à 18,18 mg/g PS chez la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174. De leur côté, NH_4Cl et lysine-HCl étaient des sources défavorables pour sa production par le mutant *A. ochraceus* M6 (23,51 et 2,51 mg/g PS, respectivement) comparé à celle trouvée par la souche sauvage *A. ochraceus* (34,04 et 10,99 mg/g PS, respectivement). Toutes les sources d'azote organiques, excepté le lysine-HCl, ont montré des productions spécifiques d'hydroxymelleine par le mutant *A. ochraceus* M6 plus élevées comparé à celles observées par la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174.

- Nous avons remarqué que la concentration de l'acide citrique était maximale (8,61 g/l) en présence du glucose au 11^{ème} jour de l'incubation alors que cette valeur était minimale (1,29 g/l) en présence des dextrines au 11^{ème} jour de l'incubation. Ce peut être dû au catabolisme plus rapide du glucose, comparé à celui des dextrines, résultant en un excès de ces acides dans le milieu de la culture et augmentant ainsi l'acidité qui peut alors réprimer la production de melleine

- Enfin, lorsque le glycérol est utilisé comme unique source de carbone chez le mutant *A. ochraceus* M18, il inhibe totalement la production de l'acide pénicillique, du dihydroacide pénicillique, de l'hydroxymelleine et des deux nouveaux métabolites (**3** et **4**). De plus, le même effet inhibiteur du glycérol sur la production de melleine a été observé lorsqu'il est utilisé comme unique source de carbone dans le milieu de la culture contenant le mutant *A. ochraceus* M6. Cette observation est très importante pour les études biotechnologiques.

PERSPECTIVES

Dans notre étude, 18 mutants ont été obtenus, non producteurs d'OTA, dont le mutant *A. ochraceus* M18, le plus important, et que nous avons donc étudié biochimiquement. D'où :

- Des études supplémentaires sur ce mutant *A. ochraceus* M18 ont été nécessaires, telles que des études génétiques et morphologiques.

Lors de notre travail, tous les mutants ont été cultivés (par paire) sur un milieu synthétique solide afin de savoir lequel des deux produit l'OTA, ceci pour nous aider à comprendre la voie de biosynthèse de l'OTA (inconnue jusqu'à présent), mais les résultats se sont avérés négatifs. D'où :

- Il serait important de réitérer cette manipulation dans un milieu synthétique liquide afin de comparer les deux voies d'expérimentation, puisque très probablement les deux souches ne se sont pas bien développées sur le milieu synthétique solide.

- Des études supplémentaires sur les quatre nouveaux métabolites doivent être engagées, telle que le marquage, pour nous aider à savoir si ces composés sont des intermédiaires ou non dans la biosynthèse de l'OTA ou de l'acide pénicillique ; il serait également particulièrement intéressant d'étudier leurs toxicités.

- Il est possible d'envisager d'appliquer le mutant *A. ochraceus* M6, qui est d'important producteur de melleine et d'hydroxymelleine (deux composés herbicides) dans le domaine de la biotechnologie.

- Il serait enfin plus qu'intéressant d'étudier les 16 mutants, inexploités dans notre travail, pour caractériser d'autres nouveaux métabolites et tenter de comprendre la voie de biosynthèse de l'OTA ou d'autres métabolites.

REFERENCES BIBLIOGRAPHIQUES

A

Abbott, S.P. (2002). Mycotoxins and indoor molds. *Indoor Environment Connections* **3**, 14-24.

Abdollahi, A. and Buchanan, R.L. (1981). Regulation of aflatoxin biosynthesis: characterization of glucose as an apparent inducer of aflatoxin production. *J Food Sci* **46**, 143-146.

Abu-Seidah, A.A. (2003). Secondary metabolites as co-markers in the taxonomy of *Aspergilli*. *Acta Microbiologica Polonica* **52**, 15-23.

Adams, R. Z. (2002). Indoor Environment Connections Featured Public Library Closes Down for Mold Investigation www.ieconnections.com/archive/jan_01/jan-01.htm

Agrawal, R.; Deepika, N. and Joseph, R. (1999). Strain improvement of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. by induced mutation for biotransformation of α -Pinene to Verbenol. *Biotechnol Bioeng* **63**, 249-252.

Aharonowitz, Y. and Demain, A. L. (1978). Carbon catabolite regulation of cephalosporin production in *Streptomyces clavuligerus*. *Antimicrob Agents Chemother* **14**, 159-164.

Aharonowitz, Y. (1980). Nitrogen metabolite regulation of antibiotic biosynthesis. *Annu Rev Microbiol* **34**, 209-233.

Anderegg, R.J.; Bieman, K.; Buchi, G. and Cushman, M. (1976). Malformin C, a new metabolite of *Aspergillus niger*. *J Am Chem Soc* **98**, 3365-3370.

Anderson, R. K. I. and Jayaraman, K. (2003). Influence of Carbon and Nitrogen Sources on the Growth and Sporulation of *Bacillus thuringiensis* var *Galleriae* for Biopesticide Production. *Chem Biochem Eng Q.* **17** (3), 225–231.

Asan, A. (2000). Checklist of *Aspergillus* and *Penicillium* species reported from Turkey. *Tr J of Botany* **24**, 151-167.

Aschroft, A.E. (1997). Ionization methods in organic mass spectrometry. The Royal Society Chemistry, Cambridge.

Assante, G.; Locci, R.; Camarda, L.; Merlini, L. and Nasini, G. (1977). Screening of the genus *Cercospora* for secondary metabolites. *Phytochemistry* **16**, 243-247.

Assil, H.I. and Sporns, P. (1991). ELISA, and HPLC methods for analysis of fumagillin and its decomposition products in Honey. *J Agric Food Chem* **39**, 2206-2213.

Ayres, G.I.; Mund, T.I. and Sondin, E.W. (1980). Microbiology of Food Spices and Condiments. A Series of Books in Food and Nutrition. edn. Schmeigert, 249 pp.

Aziz, N.H. and Smyk, B. 2002. Influence of UV radiation and nitrosamines on the induction of mycotoxins synthesis by nontoxigenic moulds isolated from feed samples. *Nahrung/Food* **46**, 118-121.

Aziz, N. H. and Moussa, L. A. A. (2002). Influence of gamma-radiation on mycotoxin producing moulds and mycotoxins in fruits. *Food control*. **13**, 281-288.

Aziz, N.H. (1987). Etiology of Toxin-Producing Fungi from the Class of Deuteromycetes Occurring in Various Feed Products. Ph.D. Thesis, Agricultural University, Cracow, Poland.

Aziz, N.H. and Y.A. Youssef. (1991). Occurrence of aflatoxins and aflatoxin-producing moulds in fresh and processed meat in Egypt. *Food Addit Contam.* **3**, 321-331.

B

Baker, T.C.; Nishida, R. and Roelods, W.L. (1981). Close range attraction of female Oriental fruit moths to herbal scent of male hairpencils. *Science* **214**, 1359-1361.

Balcells, M.; Canela, R.; Coll, J.; Sanchis, V. and Torres, M. (1995). Effect of fungal metabolites and some derivatives against *Tribolium castaneum* (Herbst) and *Nezara viridula*. *Pesticide Science* **45**, 319-23.

Bando, M.; Hasegawa, M.; Tsuboi, Y.; Miyake, Y.; Shiina, M.; Ito, M.; Handa, H.; Nagai, K. and Kataoka, T. (2003). The mycotoxin penicillic acid inhibits fas ligand – induced apoptosis by blocking self-processing of caspase-8 in death – inducing signalling complex. *J Biol Chem* **278**, 5786-93.

Basak, K., and Majumdar, S.K. (1973). Utilization of carbon and nitrogen source of *Streptomyces kanamyceticus* for kanamycin production. *Antimicrob Agents Chemother* **4**, 6-10.

Behal, V.; Hostalek, Z. and Vanek, Z. (1979). A hydrotetracycline oxygenase activity and biosynthesis of tetracycline in *streptomyces aurofaciens*. *Biotechnol Lett* **1**, 177-182.

Bennett, J.W.; Rubin, P.L.; Lee, L.S. and Chen, P.N. (1979). Influence of trace elements and nitrogen source on versicolorin production by a mutant strain of *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* **69**, 161-166.

Bennett, J.W. (1985). Taxonomy of fungi and biology of the *Aspergilli*. In A.L. Demain and N.A. Solomon, (eds.), *Biology of industrial microorganisms*. Benjamin Cummings Publishing Co., Menlo Park, CA.

Bennett, J.W. (1987). Mycotoxins, mycotoxicoses, mycotoxicology and mycopathologia. *Mycopathologia* **100**, 3-5.

Bestmann, H.J.; Kern, F.; Schafer, D. and Witschel, M.C. (1992). 3,4-Dihydroisocoumarins, a new class of ant trail pheromones. *Angew Chem Int Ed Engl* **31**, 795-796.

Bhatnagar, R.K.; Ahmad, S.; Mukerji, K.G. and Venkitasubramanian, T.A. (1986). Nitrogen metabolism in *Aspergillus parasiticus* NRRL 3240 and *A. flavus* NRRL 3537 in relation to aflatoxin production. *J Appl Bacteriol* **60**, 203-211.

Bihel, F.; Quéléver, G.; Lelouard, H.; Petit, A. ; Alvès da Costa, C. ; Pourquié, O. ; Checler, F. ; Thellend, A. ; Pierre, P. and Kraus, J. L. (2003). Synthesis of new 3-Alkoxy-7-amino-4-chloro-isocoumarin derivatives as new β -Amyloid peptide production inhibitors and their activities on various classes of protease. *Bioorganic and Medicinal Chemistry* **11**, 3141-3152.

Bizukojc, M. and Ledakowicz, S. (2003). Morphologically structured model for growth and citric acid accumulation by *Aspergillus niger*. *Enzyme and Microbial Technology* **32**, 268-281.

Blum, M.S.; Footitt, R. and Fales, H.M. (1992). Defensive chemistry and function of the anal exudate of the thrips *Haplothrips leucanthemi*. *Comp Biochem Physiol* **102C**, 209-211.

Blum, M.S.; Jones, T.H.; Howard, D.F. and Overal, W.L. (1982). Biochemistry of termite defenses: *Coptotermes*, *Rhinotermes* and *Cornitermes*. *Comp Biochem Physiol* **71B**, 731-733.

Blumenthal, C.Z. (2004). Production of toxic metabolites in *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, and *Trichoderma reesei*: justification of mycotoxin testing in food grade enzyme preparations derived from the three fungi. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **39**, 214-228.

Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. and Zeeck, A. (2002). Big effects from small changes: possible ways to explore nature's chemical diversity. *Chembiochem* **3**, 619-627.

Bode, H. B. and Zeeck, A. (2000). UV mutagenesis and enzyme inhibitors as tools to elucidate the late biosynthesis of the spirobisanaphthalenes. *Phytochemistry* **55**, 311-316.

Bo-Shim, W. and Woloshuk, C. P. (1999). Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* **177**, 109-116.

Boysen, M.E.; Jacobsson, K.G. and Schnurer, J. (2000). Molecular identification of species from the *Penicillium roqueforti* group associated with spoiled animal feed. *Appl Environ Microbiol* **66**, 1523-1526.

Brana, A. F. and Demain, A. L. (1988). Nitrogen control of antibiotic biosynthesis in actinomycetes. In *Nitrogen Source Control of Microbial Processes*, pp. 99-119. Edited by S. Sanchez-Esquivel. Boca Raton, FL: CRC Press.

Brereton, R. G.; Garson, M. J. and Staunton, J. (1984). Biosynthesis of fungal metabolites: asperlactone and its relationship to other metabolites of *Aspergillus melleus*. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry* **5**, 1027-33.

Brown, A. G. (1995). Recent examples of novel secondary metabolites. *Folia Microbiol.* **40**, 31-42.

Bruinink, A.; Rasonyi, T. and Sidler, C. (1998). Differences in neurotoxic effects of ochratoxin A, Ochracin and ochratoxin α *in Vitro*. *Nat Toxins* **6**, 173-177.

Buchanan, R.L. and Stahl, H.G. (1984). Ability of various carbon sources to induce and support aflatoxin biosynthesis by *Aspergillus parasiticus*. *J Food Safety* **6**, 271-279.

C

Cabanes, E.J.; Accensi, F.; Bragulat, M.R.; Abarca, M.L.; Castella, G. ; Minguez, S. and Pons, A. (2002). What is the source of ochratoxin A in wine ?. *Int J Food Microbiol* **79**, 213-215.

Camarda, L. ; Merlini, L. and Nasini, G. (1976). Metabolites of *Cercospora*. Taiwapyrone, an α -pyrone of unusual structure from *Cercospora Taiwanensis*. *Phytochemistry* **15**, 537-539.

Cane, D.E.; Walsh, C.T. and Khosla, C. (1998). Harnessing the biosynthetic code: combinations, permutations, and mutations. *Science* **282**, 63-68.

Cannon, P.F. (1997). In *The Biodiversity of Tropical Microfungi* (K.D. Hyde, ed.), pp. 255-278. Hong Kong University Press, Hong Kong.

Cardova, E.; Kremen, A.; Vanek, Z. and Hostalek, Z. (1976). Regulation and biosynthesis of secondary metabolites, XVII: adenylate level and chlorotetracycline production in *Streptomyces aureofaceins*. *Folia Microbiol* **21**, 481-487.

Carlton, W.W. and Tuite, J. (1977). In "Mycotoxins in human and animal health" (J.V. Rodricks, C.W. Hesseltine, and M.A. Mehlman, eds.), p. 525. Pathotox Publishers, Park Forest South, Illinois.

Cartes, H. J. (1990). Multidimensionnal chromatography, Dekker. In: Tranchant, J. Manuel pratique de chromatographie en phase gazeuse 4^e edition, Masson, Paris, 1995.

Castegnaro, M.; Mohr, U.; Pfohl-Leszkowicz, A.; Esteve, J.; Steinmann, J.; Tillman, T.; Michelin, J. and Bartsch, H. (1998). Sex- and strain-specific induction of renal tumors by ochratoxin A in rats correlates with DNA adduction. *Int J Cancer* **77**, 70-75.

Chadha, B.S. and Garcha, H.S. (1992). Mixed cultivation of *Trichoderma reesei* and *Aspergillus ochraceus* for improved cellulase production. *Acta Microbiol Hung* **39**, 61-67.

Chang, P.K.; Ehrlich, K.C.; Yu, J.; Bhatnagar, D. and Cleveland, T.E. (1995). Increased expression of *Aspergillus parasiticus aflR*, encoding a sequence specific DNA-binding protein, relieves nitrate inhibition of aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **61**, 2372-2377.

Chen, K.C., Yin, W.S.; Tiu, C. and Houn, J.Y. (1994). 11 alpha-hydroxylation of progesterone using modified alginate-immobilized cells. *Enzyme Microb Technol* **16**, 551-555.

Ciegler, A. and Kurtzman, C. P. (1970). Penicillic acid production by blue-eye fungi on various agricultural commodities. *Appl Microbiol* **20**, 761-764.

Clardy, J.; Springer, J.P.; Buchi, G.; Matsuo, K. and Wightman, R. (1975). Tryptoquivaline and tryptoquivalone, two tremorganic metabolites of *Aspergillus clavatus*. *J Am Chem Soc* **97**, 663-665.

Clevsrton, G. and H. Ljunggren. (1985). Aflatoxin formation and the dual phenomenon. *Mycopathologia* **92**, 129-139.

Coker, R. (1995). Controlling mycotoxins in oilseeds and oilseed cakes. *Chem Ind* **7**, 260-264.

Cole, J. and Cox, R.H. (1981). Handbook of toxic fungal metabolites. New York: Academic press.

Cole, R.J.; Kirksey, J.W.; Dorner, J.W.; Wilson, D.M.; Johnson, J.C.; Johnson, A.N.; Bedell, D.M.; Springer, J.P.; Chexal, K.K.; Clardy, J.C. and Cox, R.H. (1977). Mycotoxins produced by *Aspergillus fumigatus* species isolated from molded silage. *J Agric Food Chem* **25**, 826-830.

Cole, R.J.; Moore, J.H.; Davis, N.D.; Kirksey, J.W. and Diener, U.L. (1971). 4-Hydroxymellein: a new metabolite of *Aspergillus ochraceus*. *J Agr Food Chem* **19**, 909-911.

Corsini, E. and Prieto, P. (2004). New insights into the mechanisms involved in renal proximal tubular damage induced in vitro by ochratoxin A. *J Biochem Mol Toxicol* **18**, 43-9.

Creppy, E.E.; Baudrimont, I. and Anne, M. (1998). How aspartame prevents the toxicity of ochratoxin A. *J Toxicol Sci* **23**, 165-172.

Crueger, W. and Crueger, A. (1984). Antibiotics. In: Brock TD (ed) Biotechnology: a textbook of industrial microbiology Akademische Verlagsgesellschaft, Wiesbaden, p. 203.

D

Dai, J. R.; Carté, B. K.; Sidebottom, P. J. and Butler, M. S. (2001). Circumdatin G, a new alkaloid from the fungus *Aspergillus ochraceus*. *J Nat Prod* **64**, 125-126.

Damoglou, A.D.; Downey, G.A. and Shannon, W. (1984). The production of ochratoxin A and citrinin in barley. *J Sci Food Agric* **35**, 395-400.

Da Silva, M.C.; Bertolini, M.C. and Ernandes, J.R. (2001). Biomass production and secretion of hydrolytic enzymes are influenced by the structural complexity of the nitrogen source in *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus nidulans*. *J Basic Microbiol* **41**, 269-280.

Daivs, P.J. (2001). Molds, Toxic Molds, and Indoor Air Quality. www.library.ca.gov/crb/01/notes/v8n1.pdf

Deacon, J. W. (1980). Introduction to modern microbiology. *Basic Microbiology* **7**, 100-105. Baihukan, Tokyo (in Japanese).

De Guzman, F.S.; Gloer, J.B.; Wicklow, D.T. and Dowd, P.F. (1992). New diketopiperazine metabolites from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus*. *J Nat Prod* **55**, 931-939.

De Guzman, F.S.; Bruss, D.R.; Rippentrop, J.M.; Gloer, K.B.; Gloer, J.B.; Wicklow, D.T. and Dowd, P.F. (1994). Ochrindoles A-D: New bis-indolyl benzenoids from the sclerotia of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3519. *J Nat Prod* **57**, 634-639.

Demain, A. L. (1982). Catabolite regulation in industrial microbiology, pp. 3-20 in *Overproduction of microbial products*, (V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek, Eds). Academic Press, New York.

Demain, A.L. (1986). Control of secondary metabolism in *Actinomycetes*, pp. 215-225, in *Biological, Biochemical and Biomedical Aspects of Actinomycetes*, (G. Szabo, S. Biro, M. Goodfellow, Eds). *Proc Sixth Internat Symp Actinomyces Biology*, Academiai Kiado, Budapest.

Demain, A. L. (1989). Carbon source regulation of idiolite biosynthesis in actinomycetes. In: Shapiro, S., editor. *Regulation of secondary metabolism in actinomycetes*. Boca Raton, FL: CRC Press, p. 127-34.

Demain, A.L. (1991). Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. *Proc. Natl. Sci. Counc, Repub China B* **15**, 251-65.

Demain, A. L. (1994). Microbial secondary metabolism: a New Theoretical Frontier for Academia, a new opportunity for industry. *Internat. Conference on Microbial Secondary Metabolism*, Interlaken.

Devys, M.; Barbier, M.; Bousquet, J. F. and Kollmann, A. (1992). Isolation of the new (-)-(3R,4S)-4-hydroxymellein from the fungus *Septoria nodorum* Berk. *Z. Naturforsch* **47C**, 779-781.

Diaz, G.J. and Boermans, H.J. (1994). Fumonisin toxicosis in domestic animals: a review. *Vet Hum Toxicol* **36**, 548-555.

Diekman, M.A. and Green, M.L. (1992). Mycotoxins and reproduction in domestic livestock. *J Anim Sci* **70**, 1615-1627.

Domsch, K.H.; Gams, W. and Anderson, T.H. (1980). Compendium of soil fungi. London, Academic press.

Dose, K.; Bieger-Dose, A.; Dillmann, R.; Kerz, O.; Klein, A.; Rolf, A. and Stridde, C. (1996). UV photobiochemistry of anhydrobiotic organisms at extremely low temperatures. *Advances in Space Research* **18**, 69-74.

Doull, J.C. and Vining, L.C. (1990). Physiology of antibiotic production in actinomyces and some control mechanisms. *Biotech Adv* **8**, 141-158.

Durley, R.C.; Macmillan, J.; Simpson, T.J.; Glen, A.T. and Turner, W.B. (1975). Fungal products. Part XIII. Xanthomegnin, viomellein, rubrosulphin, and viopurpurin, pigments from *Aspergillus sulphureus* and *Aspergillus melleus*. *J. Chem. Soc. Perkin*, 163-169.

Eltem, R. (2004). Colonial and morphological characteristics of some *Aspergillus* Fr.:Fr. Species isolated from vineyards in Manisa and Izmir Provinces (Turkey). *Turk J Bot* **28**, 287-298.

Elvidge, J. A.; Jaiswal, D.K.; Jones, J.R. and Thomas, R. (1977). Tritium nuclear magnetic resonance spectroscopy. Part 7. New information from the tritium distribution in biosynthetically labelled penicillic acid. *J Chem Soc Perkin Trans 1*, **9**, 1080-1083.

F

Feng, B.; Friedlin, E. and Marzluf, G.A. (1994). A reporter gene analysis of penicillin biosynthesis gene expression in *Penicillium chrysogenum* and its regulation by nitrogen and glucose catabolite repression. *Appl Environ Microbiol* **60**, 4432-4439.

Feng, G.H. and Leonard, T.J. (1998). Culture conditions control expression of the genes for aflatoxin and sterigmatocystin biosynthesis in *Aspergillus parasiticus* and *A. nidulans*. *Appl Environ Microbiol* **64**, 2275-2277.

Ferreira, N.P. (1967). Recent advances in research on ochratoxin, part 2. Microbiological aspects, p. 157-168. In R.I.Mateles and G.N. Wogan (ed.). *Biochemistry of some foodborne microbial toxins*. M.I.T. Press, Cambridge.

Ferreira, N.P. (1968). The effect of amino acids on the production of ochratoxin A in chemically defined media. *Antonie van Leeuwenhoek J Microbiol Serol* **34**, 433-440.

Filtenborg, O.; Frisvad, J.C. and Svendsen, J.A. (1983). Simple screening method for moulds producing interacellular mycotoxins in pure cultures. *Appl Environ Microbiol* **45**, 581-585.

Follmann, W.; Hillebrand, I.E.; Creppy, E.E. and Bolt, H.M. (1995). Sister chromatid exchange frequency in cultured isolated porcine urinary bladder epithelial cells (PUBEC) treated with ochratoxin A and α . *Arch Toxicol* **69**, 280-286.

Fouet, A.; Jin, S. F.; Raffel, G. and Sonenshein, A. L. (1990). Multiple regulatory sites in the *Bacillus subtilis citB* promoter region. *J Bacteriol* **172**, 5408-5415.

Fischer, G. and Dott, W. (2003). Relevance of airborne fungi and their secondary metabolites for environmental, occupational and indoor hygiene. *Archives Microbiol* **179**, 75-82.

Fraleigh, S., Bungay, H. and Fiechter, A. (1989). Minireview-regulation of oxidoreductive yeast metabolism by extracellular factors. *J Biotechnol* **12**: 185-198.

Frisvad, J.C. and Thrane, U. (1987). Standarized high-performance liquid chromatography of 182 mycotoxins and other fungal metabolites based on alkylphenone retention indices and UV-VIS spectra (diodearray detection). *J Chromatogr A* **404**, 195-214.

Frisvad, J. C. and Filtenborg, O. (1989). Terverticillate penicillia: chemotaxonomy and mycotoxin production. *Mycologia* **81**, 837-861.

Frisvad, J.C. (1989). The connection between the *penicillia* and *aspergilli* and mycotoxins with special emphasis on misidentified isolates. *Arch Env Contam Tox* **18**, 452-467

Frisvad, J. C. and Samson, R. A. (1991). Filamentous fungi in foods and feeds: ecology, spoilage, and mycotoxin production, p.31-68. In D. K. Arora, K. G. Mukerji, and E. H. March (ed.), Handbook of applied mycology: foods and feeds, vol. **3**. Marcel Dekker, Inc., New York, N. Y.

Frisvad, J.C. (1998). Secondary metabolites and species models in *Penicillium* and *Aspergillus*. Dr. Tech. Dissertation. Department of Biotechnology, Technical University of Denmark, Lyngby.

Frisvad, J.C. and Thrane, U. (2002). Mycotoxin production by common filamentous fungi. In: Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C.; Filtenborg, O. (Eds.), Introduction to food- and Air borne fungi, sixth ed. Centraalbureau voor Schimmelcultures, Utrecht, pp. 321-330.

Fujii, I.; Watanabe, A.; Sankawa, U. and Ebizuka, Y. (2001). Identification of a Claisen cyclase domain in fungal polyketide synthase *wA*, a naphthopyrone synthase of *Aspergillus nidulans*. *Chem Biol* **8**, 189-197.

G

Gaitatzis, N.; Silakowski, B.; Kunze, B.; Nordsiek, G.; Blocker, H.; Hofle, G. and Muller, R. (2002). The biosynthesis of the aromatic myxobacterial electron transport inhibitor stigmatellin is directed by a novel Type of Modular polyketide synthase. *J Biol Chem* **277**, 13082-13090.

Gaitatzis, N. ; Hans, A. ; Muller, R. and Beyer, S. (2001). The *mtaA* gene of the myxothiazol biosynthetic gene cluster from *Stigmatella aurantiaca* DW4/3-1 Encodes a phosphopantetheinyl Transferase that activates polyketide synthases and polypeptide synthetases. *J Biochem* **129**, 119-124.

Gallo, M. and Katz, E. (1972). Regulation of secondary metabolite biosynthesis: catabolite repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. *J Bacteriol* **109**, 659-667.

Garson, M. J.; Staunton, J and Jones, P. G. (1984). New polyketide metabolites from *Aspergillus melleus*: structural and stereochemical studies. *Journal of the Chemical Society, Perkin Transactions 1: Organic and Bio-organic Chemistry* (1972-1999) **5**, 1021-6.

Gennari, A.; Pazos, P.; Boveri, M.; Callaghan, R.; Casado, J.; Maurici, D.; Giordano, W.; Avalos, J.; Cerda-Olmedo, E. and Domenech, C. E. (1999). Nitrogen availability and production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiol Lett* **173**, 389-393.

Gonzalez, R.; Islas, L.; Obregon, A. M. ; Escalante, L. and Sanchez, S. (1995). Gentamicin formation in *Micromonospora purpurea* : stimulatory effect of ammonium. *J Antibiot* **48**, 715-9.

Gqaleni, N.; Smith, J. E.; Lacey, J. and Gettinby, G. (1997). Effects of temperature, water activity, and incubation time on production of Aflatoxins and Cyclopiazonic acid by an isolate of *Aspergillus flavus* in surface agar culture. *Appl Environ Microbiol* **63**, 1048-1053.

Graniti, A. (1991). Phytotoxins and their involvement in plant diseases. *Experientia* **47**, 751-755.

Grove, J.F. and Pople, M. (1979). Metabolic products of *Fusarium larvarum* Fuckel. The fusarentins and the absolute configuration of monocerin. *JCS Perkin* **1**, 2048-2051.

Gupta, S. and Sharma, C.B. (1995). Citric acid fermentation by mutant strain of *Aspergillus niger* resistant to manganese ions inhibition. *Biotechnol Lett* **17**, 269-274.

H

Haavik, H.I. (1974). Studies on the formation of bacitracin by *Bacillus lichenformis*: role of catabolite repression and organic acids. *J Gen Microbiol* **84**, 321-326.

Hadidane, R.; Bacha, H.; Creppy, E.E.; Hammami, M.; Ellouze, F. and Dirheimer G. (1992). Isolation and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by *Aspergillus ochraceus*. *Toxicology* **76**, 233-43.

Haggbloom, P. (1982). Production of ochratoxin A in barley by *Aspergillus ochraceus* and *Penicillium viridicatum*: effect of fungal growth, time, temperature, and inoculum size. *Appl Environ Microbiol* **43**, 1205-1207.

Hajjaj, H.; Niederberger, P. and Duboc, P. (2001). Lovastatin biosynthesis by *Aspergillus terreus* in a chemically defined medium. *Appl Environ Microbiol* **67**, 2596-602.

Hall, G. and Hawksworth, D.L. (1992). *Shell Agric* **16**, 18-21.

Hammond, P.M. (1992). In *Global Diversity: status of the Earth's Living Resources* (B. Groombridge, ed), pp. 17-39. Chapman and Hall, London.

Hanson, R. S. and Phillips, J. A. (1981). Chemical composition. In : Gerhardt P. *et al.* (eds) *Manual of methods for general bacteriology*. Washington, D.C.: American Society for Microbiology, pp 328-331.

Hao, X.; Ronald, R.; David, A. and Avdrew, A.(1996). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 648-655.

Harris, J. P. and Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **58**, 709-716.

Harris, J. P. and Mantle, P. G. (2001). Biosynthesis of diaportin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **57**, 165-169

Hawksworth, D.L. (1991). The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, conservation. *Mycol Res* **95**, 641-655.

Heim, J.; Shen, Y. Q.; Wolfe, S. and Demain, A. L. (1984). Regulation of isopenicillin N synthetase and deacetoxycephalosporin C synthetase by carbon source of *Cephalosporium acremonium*. *Appl Microbiol Biotechnol* **19**, 232-236.

Heywood, V.H. (1995). *Global Biodiversity Assessment*. Cambridge University Press, Cambridge.

Hocking, A.D. and Pitt, J.I. (1996). Fungi and mycotoxins in food. In: *Fungi of Australia*. **1B**, 315-342.

Holler, U.; Konig, G.M. and Wright, A. D. (1999). Three new metabolites from marine-derived fungi of the Genera *Coniothyrium* and *Microsphaeropsis*. *J Nat Prod* **62**, 114-118.

Hoult, J. R. S. and Paya, M. (1996). Pharmacological and biochemical actions of simple coumarins: Natural products with therapeutic potential. *Gen Pharmac* **27**, 713-722.

Hsieh, D.P.H. and Mateles, R.I. (1970). The relative contribution of acetate and glucose to aflatoxin biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **208**, 482.

Hubbard, C. R.; Mitchell, A. D. and Ware, G.M. (1977). 4-Hydroxy-4H-furo [3,2-C] Pyran-2 (6H)-one (DL- patulin). *Acta Crystallogr Sect B* **33**, 928-931.

Hutchinson, C.R. and Fujii, I. (1995). Polyketide synthase gene manipulation: structure-function approach in engineering novel antibiotics. *Annu Rev Microbiol* **49**, 201-238.

Hurley, L. H. and Bialek, D. (1974). Regulation of antibiotic production: Catabolite inhibition and the dualistic effect of glucose on indolmycin production. *J Antibiot* **27**, 49-56.

Hutchinson, C.R.; Kennedy, J.; Park, C.; Kendrew, S.; Auclair, K. and Vederas, J. (2000). Aspects of the biosynthesis of non-aromatic fungal polyketides by iterative polyketide synthases. *Antonie van Leeuwenhoek* **78**, 287-295.

I

Içgen, Y.; İçgen, B. and Özcengiz (2002). Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus thuringiensis* : II. Effects of carbon and nitrogen sources. *Res Microbiol* **153**, 603-609.

Iizuka, H. and Iida, M. (1962). Maltoryzine, a new toxic metabolite produced by a strain of *Aspergillus oryzae* var. *microsporus* isolated from the poisonous malt sprout. *Nature* (London) **196**, 681-682.

Inoue, S.; Nishizawa, Y. and Nagai, S. (1983). Stimulatory effect of ammonium on stryptomycin formation by *Stryptomycetes griseus* growing on a glucose minimal medium. *J Ferment Technol* **61**, 7-12.

Ives, P.R. and Bushell, M. E. (1997). Manipulation of the physiology of clavulanic acid production in *Streptomyces clavuligerus*. *Microbiology* **143**, 3573-3579.

J

Jayant, N. and Suresh, R. (1999). Moderate protective effect of 6-MFA, a microbial metabolite obtained from *Aspergillus ochraceus* on immunological liver injury in mice. *Comp. Immunol. Microbiol Infect dis* **22**, 15-25.

Johanning, E.; Gareis, M.; Nielsen, K.; Dietrich, R. and Martlbauer, E. (2002). Airborne Mycotoxin Sampling and Screening Analysis.

<http://www.ibt.dtu.dk/mycology/staff/kfn/papers/Airborne-mycotoxin2002.pdf>

Jonathan, P. H. and Peter, G. M. (2001). Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **58**, 709-716.

Jonathan, P. H. and Peter, G. M. (2001). Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus ochraceus*. *Phytochemistry* **57**, 165-169.

Jørgensen, K. and Vahl, M. (1999). Analysis of ochratoxin A in pig kidney and rye flour using liquid chromatography tandem mass spectrometry (LC/MS/MS). *Food Addit Contam* **16**, 451-456.

Junker, B.; Mann, Z.; Galliot, P.; Byrne, K. and Wilson, S. (1998). Use of soya bean oil and ammonium sulphate to optimize secondary metabolite production. *Biotech Bioeng* **60**, 580-588.

K

Kacholz, T. and Demain, A.L. (1983). Nitrate repression of averufin and aflatoxin biosynthesis. *J Nat Prod* **46**, 499-506.

Kanno, H. and Taylor, R. (2002). Tandem oxidation processes: the direct conversion of activated alcohols to oximes; synthesis of citaldoxime. *Synlett* **8**, 1287-1290.

Keller, B.; Winzeler, H.; Winzeler, M. and Fried, P.M. (1994). Differential sensitivity of wheat embryos against extracts containing toxins of *Septoria nodorum*: first Steps towards *in vitro* selection. *J Phytopathology* **141**, 233-240.

Keller, N.P.; Nesbitt, C.; Sarr, B.; Phillips, T.D. and Burow, G.B. (1997). pH regulation of sterigmatocystin and aflatoxin biosynthesis in *Aspergillus* spp. *Phytopathology* **87**, 643-648.

Keller-Schierlein, W. and Kupfer, E. (1979). Stoffwechselprodukte von mikroorganismen. 186. Mitteilung. Über die Aspochalasine A, B, C and D. *Helv Chim Acta* **62**, 1501-1524.

Kennedy J. and Hutchinson C.R. (1999). Nurturing nature: engineering new antibiotics. *Nat Biotechnol* **17**, 538-9.

Kfir, R.; Johannsen, E. and Vleggaar, R. (1986). Mutagenic activity of Austocystins: Secondary metabolites of *Aspergillus Ustus*. *Bull Environ Contam Toxicol* **37**, 643-650.

Kinoshita, Y.; Yamamoto, Y.; Kurokawa, T. and Yoshimura, I. (2001). Influences of nitrogen sources on usnic acid production in a cultured mycobiont of the lichen *Usnea hirta*. *Biosci Biotech Biochem* **65**, 1900-1902.

Klich, M.A. (1993). Morphological studies of *Aspergillus* section Versicolores and related species. *Mycologia* **85**, 100-107.

Kokubun, T.; Veitch, N. C.; Bridge, P. D. and Simmonds, M. S. J. (2003). Dihydroisocoumarins and a tetralone from *Cytospora eucalypticola*. *Phytochemistry* **62**, 779-782.

Kosemura, S. (2003). Meroterpenoids from *Penicillium citreo-viride* B. IFO 4692 and 6200 hybrid. *Tetrahedron* **59**, 5055 – 5072.

Krivobok, S.; Seigle-Murandi, F.; Steiman, R. and Marzi, D. (1987). Screening methods to detect toxigenic fungi in liquid medium. *J Microbiol Methods* **7**, 29-36.

Krohn, K.; Bahramsari, R.; Florke, U.; Ludewig, K.; Kliche-Spory, C.; Michel, A.; Aust, H. J.; Draeger, S.; Schulz, B. and Antus, S. (1997). Dihydroisocoumarins from fungi: Isolation, structure elucidation, circular dichroism and biological activity. *Phytochemistry* **45**, 313-320.

Kvesitadze, G. I.; Kvachadze, L. L.; Pavlenishvili, M. D. and Koridze, V. V. (1981). Selection of microscopic fungi producing acid-stable α -amylase and glucoamylase. *Mikrobiologiya* **50**, 807-12.

L

Lai, L. T., Pan, C. C. and Tzeng, B. K. (2003). The influence of medium design on lovastatin production and pellet formation with a high - producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged cultures. *Process Biochem* **38**, 1317-1326.

Lam, K. S., Mattei, J. and Forenza, S. (1989). Carbon catabolite regulation of rebeccamycin production in *Saccharothrix aerocolonigenes*. *J Ind Microbiol* **4**, 105-108.

Langseth, W.; Stenwing, H.; Sogn, L. and Mo, E. (1993). Growth of moulds and production of mycotoxins in wheat during drying and storage. *Acta Agric Scand [B] Soil Plant Sci*, **43**, 32-37.

Lara, F.; Mateos, R. C.; Vazquez, G. and Sanchez, S. (1982). Induction of penicillin biosynthesis by L-glutamate in *Penicillium chrysogenum*. *Biochem Biophys Res Commun* **105**, 172-8.

Larsen, T. O.; Svendsen, A. and Smedsgaard, J. (2001). Biochemical characterization of ochratoxin A – producing strains of the Genus *Penicillium*. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3630-3635.

Lebrihi A.; Germain P. and Lefebvre G. (1987). Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid production by *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **26**, 130-135.

Lebrihi, A.; Lefebvre, G. and Germain, P. (1988). Carbon catabolite regulation of cephamycin C and expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. *Appl Microbiol Biotechnol* **28**, 44-51.

Lebrihi A.; Lamsaif D.; Lefebvre G and Germain P. (1992). Effect of ammonium ions on spiramycin biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. *Appl Microbiol Biotechnol* **37**, 382-7.

Lee, S.H. (1997). Ammonium ion affecting tylosin production by *Streptomyces fradiae* NRRL 2702 in continuous culture. *Lett Appl Microbiol* **25**, 349-352.

Lee, E. S.; Paik, I. K. and Hahm, Y. T. (2000). Screening of phytase overproducing strains in *Aspergillus* spp. By UV mutagenesis. *Mycobiology* **28**, 119-122.

Leistner, E. (1981). In *The Biochemistry of Plants Vol. 7* (Stumpf, P.K. and Conn, E., eds), pp. 304-423. Academic Press, New York.

Li, S.; Marquardt, R.R.; Frohlich, A.A.; Vitti, T.G. and Crow, G. (1997). Pharmacokinetics of ochratoxin A and its metabolites in rats. *Toxicol Appl Pharmacol* **145**, 82-90.

Lin, C. and Shu, P. (2002). Simple and sensitive determination of citrinin in *Monascus* by GC-selected ion monitoring. *Mass Spectrometry*. **18**, 283-287.

Lin, L.; Zhang, J.; Wang, P. and Chen, J. (1998). Thin – layer chromatography of mycotoxins and comparison with other chromatographic methods. *J Chromatogr A* **815**, 3-20.

Lindenfelser, L. A. and Ciegler, A. (1977). Penicillic acid production in submerged culture. *Appl Environ Microbiol* **34**, 553-556.

Litzka, O.; Then, B. K.; Van den, B. J.; Steidl, S. and Brakhage, A.A. (1999). Transcriptional control of expression of fungal beta-lactam biosynthesis genes. *Antonie Van Leeuwenhoek*. **75**, 95-105.

Liu, B.H. and Chu, F.S. (1998). Regulation of *aflR* and its product, *AflR*, associated with aflatoxin biosynthesis. *Appl Environ Microbiol* **64**, 3718-3723.

Lopez, C. J. L. ; Perez, S. J. A. ; Sevilla, F. J. M. ; Fernandez, A. F. G. ; Grima, M. E. and Chisti, Y. (2003). Production of lovastatin by *Aspergillus terreus*: Effects of the C: N ratio and the principal nutrients on growth and metabolite production. *Enzyme Microb Tech* **23**, 270-277.

Lounès, A.; Lebrihi, A.; Benslimane, C.; Lefebvre, G. and Germain P. (1995). Regulation of valine catabolism by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. *Can J Microbiol* **41**, 800-808.

Lu, Y.; R. L. Mach; K. Affenzeller and C. P. Kubicek (1992). Regulation of alpha-amino acid reductase from *Penicillium chrysogenum* in relation to the flux from alpha-amino acid into penicillin biosynthesis. *Can J Microbiol* **38**, 758-763.

Luchese, R.H. and Harrigan, W.F. (1993). Biosynthesis of aflatoxin-the role of nutritional factors. *J Appl Bacteriol* **74**, 5-14.

Luckner, M.; Nover, L. and Bohm, H. (1977). Secondary metabolism and cell differentiation. Berlin: Springer.

Lust, G. and Lynen, F. (1968). The inhibition of the fatty acid synthetase multienzyme complex of yeast by long-chain acyl coenzyme A compounds. *Eur J Biochem* **7**, 68.

M

Madhyastha, S.; Marquardt, R.R. and Abramson, D. (1993). Effect of ochratoxin producing fungi on the chemical composition of wheat and barley. *Journal of Food Quality* **16**, 287-299.

Madsen, A.; Hald, B. and Mortensen, H.P. (1983). Feeding experiments with ochratoxin A contaminated barley for bacon pigs. 3. Detoxification by ammoniation heating + NaOH, or autoclaving. *Acta Agric Scand* **33**, 171-175.

Magasanik, K. B. (1992). Regulation of nitrogen –utilization. In: Jones, E. W., Pringle, J. R., Broach, J. R. (eds.) The molecular and cellular biology of the yeast *Saccharomyces*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol. **2**, p. 283-317.

Martain, J.F. and Demain, A.L. (1980). Control of antibiotic synthesis. *Microbiol Rev* **44**, 230-231.

Mantle, P.G. (1987). Secondary metabolites of *Penicillium* and *Acremonium*, Plenum Press, New York.

Manzoni, M.; Bergomi, S.; Rollini, M. and Cavazzoni, V. (1999). Production of lovastatin by filamentous fungi. *Biotechnol Lett* **21**, 253-7.

Martin, J.F. (1977). Control of antibiotic synthesis by phosphate. *Adv Biochem Eng* **6**, 105-127.

Martin, J.F. and Demain, A. L. (1980). Control of antibiotic biosynthesis. *Microbiol. Rev.* **44**, 230-251.

Martin, J.F., Casqueiro, J., Kosalkova, K., Marcos, A.T. and Gutiérrez, A. (1999). Penicillin and cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production. *Antonie van Leeuwenhoek* **75**, 21-31.

Martins, M.L.; Martins, H.M. and Bernardo, F. (2003). Fungal flora and mycotoxins detection in commercial pet food. *RPCV* **98**, 179-183.

Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. (1992). A review of recent advances in understanding ochratoxicosis. *J Anim Sci.* **70**, 3968-88.

Mathews, C.K. and van Holde, K.E. (1990). Biochemistry, Benjamin/Cummings, New York, pp. 593-598.

Messenger, A.J. and Turner, J.M. (1983). Effect of growth conditions on phenazine production by *Pseudomonas phenazinium*. *J Gen Microbiol* **129**, 1013-1018.

Microbial Diagnostics, Inc. (2002). Germology.<http://www.germology.com/mycotoxins.htm>

Miller, L.G. (1959). Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal Chem* **31**, 226-229.

Miller, Vincent R. (2001). Evolving PCR-Based Technologies for Bioaerosol Detection and Quantification. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona. Miller, R. Mycotoxins in Mold-Colonized Drywall Obtained from a Field Investigation. Aetotech Laboratories, Inc. Phoenix Arizona.

Mitsudo, T.; Nakagawa, Y.; Watanabe, K.; Hori, Y.; Misawa, H.; Watanabe, H. and Watanabe, Y. (1985). The first selective linear codimerization of terminal acetylenes and 1,3-dienes catalyzed by dihydridotetrakis (trialkylphosphine) ruthenium complexes. *J Org Chem* **50**, 565-571.

Mold-Help.(2001). Mycotoxin List. <http://www.moldhelp.org/fungi.mycotoxins.currentresearch.htm>

Moore, J. H.; Davis, N.D. and Diener, U.L. (1972). Mellein and 4-Hydroxymellein production by *Aspergillus ochraceus* Wilhelm. *Appl Microbiol* **23**, 1067-1072.

Moore, L. E. Fundamental of the fungi. 4th ed. Englewood Cliffs, NJ: Prentice – Hall; **1996**. p. 251-78.

Moore, B. S.; Walker, K.; Tornus, I.; Handa, S.; Poralla, K. and Floss, H.G. (1997). Biosynthetic Studies of ω -Cycloheptyl Fatty Acids in *Alicyclobacillus cycloheptanicus*. Formation of Cycloheptanecarboxylic Acid from Phenylacetic Acid. *J Org Chem* **62**, 2173-2185.

Mori, H.; Kawai, K.; Ohbayashi, F.; Kuniyasu, T.; Yamazaki, M.; Hamasaki, T. and Williams, G. M. (1984). Genotoxicity of a variety of mycotoxins in the hepatocyte primary culture /DNA repair test using rate and mouse hepatocytes. *Cancer Res* **44**, 2918-23.

Morrice, J.; Mackenzie, D.A.; Parr, A.J. and Archer, D.B. (1998). Isolation and characterization of the acetyl-CoA carboxylase gene from *Aspergillus nidulans*. *Curr Genet* **34**, 379-385.

Mühlencoert, E.; Mayer, I.; Zapf, M.W.; Vogel, R.F. and Niessen, L. (2004). Production of ochratoxin A by *Aspergillus Ochraceus*. *Europ J Plant Pathol* **110**, 651-659.

Munoz, G. A. and Agosin, E. (1993). Glutamine involvement in nitrogen control of gibberellic acid production in *Gibberella fujikuroi*. *Appl Environ Microbiol* **59**, 4317-4322.

N

Niehaus, W.G.J. and Jiang, W. (1989). Nitrate induces enzymes of the mannitol cycle and suppresses versicolorin synthesis in *Aspergillus parasiticus*. *Mycopathologia* **107**, 131-139.

Nielsen, K.F. (2002). Mould growth on building materials. Secondary metabolites, mycotoxins and biomarkers. Ph.D. Thesis. BioCentrum-DTU, Technical University of Denmark. Available from <www.biocentrum.dtu.dk/mycology/staff/scientific_staff/nielsen_kristian_f/pdf/phdkfn.pdf>

Nielsen, K. F. and Smedsgaard, J. (2003). Fungal metabolite screening: database of 474 mycotoxins and fungal metabolites for dereplication by standardised liquid chromatography-UV- mass spectrometry methodology. *J Chromatogr A* **1002**, 111-136.

(a) Nishikawa, H. (1933). *Bull Agric Chem Soc Jpn.* **9**, 107-109. **(b) Nishikawa, H. (1933).** *Bull Agric Chem Soc Jpn.* **9**, 148-151.

Nielsen, K. F. (2003). Mycotoxin production by indoor molds. *Fungal Genetics and Biology* **39**, 103-117.

Novey, H.S. and Wells, I.D. (1978). Allergic bronchopulmonary aspergillosis caused by *Aspergillus ochraceus*. *Am J Clin Pathol* **70**, 840-843.

O

Obana, H.; Kumeda, Y. and Nishimune, T. (1995). *Aspergillus ochraceus* production of 5,6-dihydropenicillic acid in culture and foods. *Journal of Food Protection* **58**, 519-523.

O'Hagan, D. (1995). Biosynthesis of fatty acid and polyketide metabolites. *Nat Prod Rep* **12**, 1-32.

O'Hagan, D. (1991). The polyketide metabolites. Ellis Horwood, New York.

Okazaki, H.; Ono, H.; Yamada, K.; Beppu, T. and Arima, K. (1973). Relationship among cellular fatty acid composition, amino acid uptake and neomycin formation in a mutant strain of *Streptomyces fradiae*. *Agric Biol Chem* **37**, 2319-23.

Oksman, C.; Kirsi, M.; Sevon, N.; Vanhala, L. and Hiltunen, R. (1994). Effect of nitrogen and sucrose on the primary and secondary metabolism of transformed root cultures of *Hyoscyamus muticus*. *Plant cell, Tissue and Organ culture* **38**, 263-72.

Omura, S. ; Tanaka, Y. ; Tanaka, H. ; Takahashi, Y. and Iwai, Y. (1980a). Stimulation of the production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. *J Antibiot* **33**, 1568-1569.

Omura, S. and Tanaka, Y. (1986). Biosynthesis of tylosin and its regulation by ammonium and phosphate. In: Regulation of secondary metabolite formation (Kleinkauf, H., Dohren, H. V., Dormauer, H. and Nesmann, G., eds.). VCH Publishers, Berlin, 306-332.

P

Pardo, E.; Marin, S.; Sanchis, V. and Ramos, A.J. (2004). Prediction of fungal growth and ochratoxin A production by *Aspergillus ochraceus* on irradiated barley grain as influenced by temperature and water activity. *Int J Food Microbiol* **95**, 79-88.

Parekh, S.; Vinci, V.A. and Strobel, R.J. (2000). Improvement of microbial strains and fermentation processes. *Appl Microbiol Biotechnol* **54**, 287-301.

Parisi, A.; Piattelli, M.; Tringali, C.; San Lio GMd and Di San Lio GM (1993). Identification of the phytotoxin mellein in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. *Phytochemistry* **32**, 865-867.

Peberdy, J.F. (1985). Biology of penicillins. In: Demain A, Soloman N (ed) Biology of industrial microorganisms. Benjamin-Cummings, Menlo Park, pp. 407-431.

Peltola, J.; Anderson, M.A.; Haahtela, T.; Mussalo-Rauhamaa, H.; Rainey, F.A.; Koppenstedt, R.M.; Samson, R.A. and Salkinoja-Salonen, M. (2001). Toxic metabolite

producing bacteria and fungus in an indoor environment. *Appl Environ Microbiol* **67**, 3269-3274.

Penalva, M. A.; R. T. Rowlands and G. Turner (1998). The optimization of penicillin biosynthesis in fungi. *Trends Biotechnol* **16**, 483-489.

Pfohl-Leszkowicz, A.; Grosse, Y.; Kane, A.; Creppy, E.E. and Dirheimer, G. (1993). Differential DNA adduct formation and disappearance in three mouse tissues after treatment with the mycotoxin ochratoxin A. *Mutat Res* **289**, 265-273.

Piepersberg, W. and Distler, J. (1997). Aminoglycosides and sugar components in other secondary metabolites. In : Rehn H-J, Reed G, editors. Products of secondary metabolism, Vol. 7. Weinheim: VCH, p.397-488.

Pier, A.C. and Richard, J.L. (1992). Mycoses and mycotoxicoses of animals caused by *Aspergilli*. In: Bennett, J.W., Klich, M.A. (Eds.), *Aspergillus*, Biology and Industrial Applications. Butterworth-Heinemann, Boston, pp. 233–248.

Pitout, M.J. (1969). The hydrolysis of ochratoxin A by some proteolytic enzymes. *Biochem Pharmacol* **18**, 485-491.

Pitt, J.I. (1987). *Penicillium viridicatum*, *Penicillium verrucosum* and production of ochratoxin A. *Appl Environ Microbiol* p. 266-269.

Pitt, J. I. and Leistner, L. (1991). Toxigenic *Penicillium* species, p. 101-118. In J. E. Smith and R. S. Henderson (ed.), Mycotoxins and animal foods. CRC Press, Inc., Boca Raton, Fla.

Placinta, C.M.; D'Mello, J.P.F. and Macdonald, A.M.C. (1999). A review of worldwide contamination of cereal grains and animal feed with *Fusarium* mycotoxins. *Anim Feed Sci Tech* **78**, 21-37.

R

Rasmussen, R.K. and Klein, H.P. (1967). Regulation of acetyl-CoA carboxylase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* **28**, 415.

Rawlings, B.J. (1999). Biosynthesis of polyketides (other than actinomycete macrolides). *Nat Prod Rep* **16**, 425-484.

Regassa, B. L.; Novick, R. P. and Betley, M. J. (1992). Glucose and nonmaintained pH decrease expression of the accessory gene regulator (agr) in *Staphylococcus aureus*. *Infect Immun* **60**, 3381-3388.

Regerat, F.; Texier, O.; Barthomeuf, C. and Fraisse, D. (1994). Microbiological conversions of solamargine. *Pharm Acta Helv* **68**, 169-171.

Reitzer, L. J. (1996). Ammonia assimilation and the biosynthesis of glutamine, glutamate, aspartate, L-alanine and D-alanine. In *Escherichia coli* and *Salmonella*: Cellular and Molecular Biology, 2 nd edn, vol. 1, pp. 391-407. Edited by F. C. Neidhardt and others. Washington, DC: American Society for Microbiology.

Ren, P.; Ahearn, D.G. and Crow, S.A. (1999). Comparative study of *Aspergillus* mycotoxin production on enriched media and construction material. *J Ind Microbiol Biot* **23**, 209-213.

Revilla, G.; Lepez-Nieto, M. J. ; Luengo, J. M. and Martín, J. F. (1984). Carbon catabolite repression of penicillin biosynthesis by *Penicillium chrysogenum*. *J Antibiot* **37**, 781-789.

Reynolds, K. A. (1998). Combinatorial biosynthesis: Lesson learned from nature. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 12744-12746.

Richard, J.L.; Lyon, R.L.; Fichtner, R.E. and Ross, P.F. (1989). Use of thin layer chromatography for detection and high performance liquid chromatography for quantiting gliotoxin from rice cultures of *Aspergillus fumigatus* fresenius. *Mycopathologia* **107**, 145-151.

Richard, J.L.; Plattner, R.D.; Mary, J. and Liska, S.L. (1999). The occurrence of ochratoxine A in dust collected from a problem household. *Mycopathologia* **146**, 99-103.

Rodwell, V.W. (1969). Biosynthesis of amino acids and related compounds, p. 317-324. In: D.M. Greenberg (ed.), metabolic pathways, vol. 3. Academic Press Inc., New York.

Rollas, S.; Kalyoncuoglu, N.; Sur-Altiner, D. and Yegenoglu, Y. (1993). 5-(4-aminophenyl)-4-substituted -2,4-dihydro-3H-1,2,4-triazole, 3-thiones: synthesis and antibacterial and antifungal activities. *Pharmazie* **48**, 308-9.

Rosenberg, E.; Krska, R.; Wissiack, R.; Kmetov, V.; Josephs, R.; Razzazi, E. and Grasserbauer, M. (1998). High-Performance liquid chromatography-atmospheric-pressure chemical ionization mass spectrometry as a new tool for the determination of the mycotoxin zearalenone in food and feed. *J Chromatogr A* **819**, 277-288.

Rosenbrook, W. J. and Carney, R. E. (1970). New metabolite from an unidentified *Aspergillus* species. *Tetrahedron Letters* **22**, 1867-70.

Rosfarizan, M. and Ariff, A. B. (2000). Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. *J Ind Microbiol Biotech* **25**, 20-24.

Rossmann, A.Y. (1994). In Biodiversity and Terrestrial Ecosystems (C.-I Peng and C.H. Chou, ed.), pp. 169-194. Institute of Botany, Academia Sinica Monograph Series No. 14, Taipei.

Rouessac, F. et Rouessac, A.. Analyse chimique: Méthodes et techniques instrumentales modernes. 2^e édition, Masson, Paris, 1995.

Rowlands, R.T. (1984). Industrial strain improvement: mutagenesis and random screening procedures. *Enzyme Microb Technol* **6**, 3-10.

Roy, A.K., K.K. Sinha, and H.K. Chourasia. (1988). Aflatoxin contamination of some common drug plants. *Appl Environ Microbiol* **54**, 842-843.

Ruckmani, A.; Varendra, A. K. and Rajendran, A. (2002). Hyper production of xylanase enzyme by mutants of *Aspergillus ochraceus*. *Asian Microbiol Biotechnol Environ Sci* **4**, 47-51.

S

Sakabe, N.; Goto, T. and Hirata, Y. (1964). The structure of citreoviridin, a toxic compound produced by *P. citreoviride* molded on rice. *Tetrahedron Lett* **5**, 1825-1830.

Samson, R.A.; Hoekstra, E.S.; Frisvad, J.C. and Filtenborg, O. (2002). Introduction to food-and airborne fungi. Sixth Ed. 389 pp. Centraalbureau Voor Schimmelcultures-Utrecht-The Netherlands.

Sanchez, S. and Demain, A. L. (2002). Metabolic regulation of fermentation processes. *Enzy Microb Technol* **31**, 895-906.

Sasaki, M.; Kaneko, Y.; Oshita, K.; Takamatsu, H.; Asao, Y. and Yokotsuka, T. (1970). Studies on the compounds produced by molds . Part VII. Isolation of isocoumarin compounds. *Agr Biol Chem* **34**, 1296-1300.

Sassa, T.; Hayakari, M.; Ikeda, M. and Miura, Y. (1971). Plant growth inhibitors produced by fungi. Part 1. Isolation and identification of penicillic acid and dihydropenicillic acid. *Agric Biol Chem* **35**, 2130-2131.

Schmidt, H.; Ehrmann, M.; Vogel, R.F.; Taniwaki, M.H. and Niessen, L. (2003). Molecular typing of *Aspergillus ochraceus* and construction of species specific SCAR-primers based on AFLP. *System Appl Microbiol* **26**, 138-146.

Schulz, B.; Sucker, J.; Aust, H.J.; Krohn, K.; Ludewig, K.; Jones, P.G. and Doring, D. (1995). Biologically active secondary metabolites of endophytic *Pezizula* species. *Mycol Res* **99**, 1007-1015.

Schwartz, R.; Liesch, J.; Hensens, O.; Zitano, L.; Honeycutt, S.; Garrity, G.; Fromtling, R.; Onishi, J. and Monaghan, R. (1988). L-657-398, a novel antifungal agent: fermentation, isolation, structural elucidation and biological properties. *J Antibiot* **41**, 1774-1779.

Searcy, J.W.; Davis, N.D. and Diener, U.I. (1969). Biosynthesis of ochratoxin A. *Appl Microbiol* **18**, 622-627.

Sekiguchi, J.; Katayama, S. and Yamada, Y. (1987). 6-Methyl-1,2,4-Benzenetriol, a new intermediate in penicillic acid biosynthesis in *Penicillium cyclopium*. *Appl Environ Microbiol* **53**, 1531-1535.

Shafikhani, S. H.; Partovi, A. A. and Leighton, T. (2003). Catabolite induced repression of sporulation in *Bacillus subtilis*. *Curr Microbiol* **47**, 300-308.

Shan, R.; Stadler, M.; Anke, H. and Sterner, O. (1997). The reactivity of the fungal toxin papyracillic acid. *Tetrahedron* **53**, 6209-6214.

Shapiro, S. (1989). Nitrogen assimilation in *actinomycetes* and the influence of nitrogen nutrition on *actinomycete* secondary metabolism. In regulation of secondary metabolism in *Actinomycetes*, pp. 135-211. Edited by S. Shapiro. Boca Raton, FL: CRC Press.

Shen, B. (2003). Polyketide biosynthesis beyond the type I, II and III polyketide synthase paradigms. *Curr Op Chem Biol* **7**, 285-295.

Shiomi, K.; Tomoda, H.; Otaguro, K. and Omura, S. (1999). Meroterpenoids with various biological activities produced by fungi. *Pure Appl Chem* **71**, 1059-1064.

Shim, W. B. and Woloshuk, C. P. (1999). Nitrogen repression of fumonisin B1 biosynthesis in *Gibberella fujikuroi*. *FEMS Microbiology Letters* **177**, 109-116.

Simpson, T.J. (1995). Polyketide biosynthesis. *Chem Ind* 407-411.

Simpson, T. J.; Ahmed, S. A.; McIntyre, C. R.; Scott, F. E. and Sadler, I. H. (1997). Biosynthesis of polyketide-Terpenoid (Meroterpenoid) metabolites Andibenin B and Andilesin A in *Aspergillus varicolor*. *Tetrahedron* **53**, 4013-4034.

Sinha, S. and Chakrabarty, S. L. (1978). Ultraviolet induced mutations in *Aspergillus wantii*. *Microbiologica Polonica* **27**, 347-52.

Smith, J. E. and Moss, M. O. (1985). Mycotoxins: formation, analysis and significance. John Wiley and Sons, Chichester, United Kingdom.

Smith, D. and Waller, J.M. (1992). Culture collections of microorganisms: their importance in tropical plant pathology. *Fitopat. Bras* **17**, 1-8.

Solé, M.; Francia, A.; Rius, N. and Lorén, J. G. (1997). The role of pH in the “glucose effect” on prodigiosin production by non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Lett Appl Microbiol* **25**, 81-84.

Solé, M.; Rius, N. and Lorén, J. G. (2000). Rapid extracellular acidification induced by glucose metabolism in non-proliferating cells of *Serratia marcescens*. *Internatl Microbiol* **3**, 39-43.

Spizek, J. and Tichy, P. (1995). Some aspects of overproduction of secondary metabolites. *Floia Microbiol* **40**, 43-50.

Sprusansky, O., Zhou, L., Jordan, S., White, J. and Westpheling, J. (2003). Identification of three new genes involved in morphogenesis and antibiotic production in *Streptomyces coelicolor*. *J Bacteriol* **185**, 6147-6157.

Stander, M.A.; Bornscheuer, U.T.; Henke, E. and Steyn, P.S. (2000). Screening of commercial hydrolases for the degradation of ochratoxin A. *J Agric Food Chem* **48**, 5736-9.

Stadler, M.; Anke, H. and Sterner, O. (1995). New metabolites with nematicidal and antimicrobial activities from the *ascomycete* *lacchnum papyraceum* (Karst.) karst. IV. Structural elucidation of novel isocoumarin derivatives. *J Antibiot* **48**, 267-70.

Staunton, J. and Sunter, D. C. (1988). Biosynthesis of canescin, a metabolite of *Aspergillus malignus*. Incorporation of methionine, acetate, succinate, and isocoumarin precursors, labelled with deuterium and carbon-13. *J Chem Soc, Perkin Transactions 1: Org Bio-Org Chem* (1972-1999) **4**, 747-54.

Staunton, J. and Sutkowski, A. (1991). Oxygen-17 NMR in biosynthetic studies: aspyrone, asperlactone and isoasperlactone, metabolites of *Aspergillus melleus*. *J Chem Soc, Chem Commun* **16**, 1106-8.

Staunton, J. (1991). The polyketide synthase (PKS) of aspyrone biosynthesis: Evidence for the enzyme bound intermediates from incorporation studies with N-acetyl-cysteamine thioesters in intact cells of *Aspergillus melleus*. *J Chem Soc, Chem Commun* 4110.

Steyn, P.S. and Holzapfel, C.W. (1967). The isolation of the methyl and ethyl esters of ochratoxins A and B, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Wilh. *J S Afr Chem Inst* **20**, 186.

Steyn, P. S. (1980). The biosynthesis of mycotoxins. Academic Press, New York, pp. 1-4.

Strauch, M. A. and Hoch, J. A. (1993a). Signal transduction in *Bacillus subtilis* sporulation. *Curr Opin Genet Dev* **3**, 203-212.

Sunesen, L. O. and Stahnke, L. H. (2003). Mould starter cultures for dry sausages-selection, application and effects. *Meat Science* **65**, 935-948.

Szakacs, G.; Morovjan, G. and Tengerdy, R. P. (1998). Production of lovastatin by a wild strain of *Aspergillus terreus*. *Biotechnol Lett* **20**, 411-5.

T

Takahashi, I. and MacKenzie, L.W. (1981). Effect of various inhibitors on sporulation of *Bacillus subtilis*. *Can J Microbiol* **30**, 80-86.

Tanaka, Y.; Taki, A.; Masuma, R. and Omura, S. (1986). Mechanism of nitrogen regulation of protylonolide biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *J Antibiot* **39**, 813-821.

Tang, L.; Zhang, Y.X. and Hutchinson, C.R. (1994). Amino acid catabolism and antibiotic synthesis: valine is source for precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and *Streptomyces fradiae*. *J Bacteriol* **176**, 6107-6119.

Taniwaki, M.H.; Pitt, J.I.; Teixeira, A.A. and Iamanaka, B.T. (2003). The source of ochratoxin A in Brazilian coffee and its formation in relation to processing methods. *Int J Food Microbiol* **82**, 173-179.

Telma, E.B.; Willibaldo, S.; Alfredo, E.M.; Janice, C. and Jorge, A.V.C. (2003). Influence of carbon, nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid state fermentation. *Z. Naturforsch* **58c**, 708-712.

TePaske, M.R.; Gloer, J.B.; Wicklow, D.T. and Dowd, P.F. (1990). Aflavazole : An antiinsectin carbazole metabolite from the sclerotia of *Aspergillus flavus*. *J Org Chem* **55**, 5299-5301.

Ter Schure, E.G.; Raeven, L. J. R. M.; Boonstra, J.; Verkleij, A. J. E. and Verrips, C. T. (1995). Nitrogen – regulated transcription and enzyme activities in continuous cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiology* **141**, 1101-1108.

Ter Schure, E. G.; Van Riel, N. A.W. and Verrips, C. T. (2000). The role of ammonia metabolism in nitrogen catabolite repression in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol. Rev.*, **24**, 67-83.

Topal, S. (1984). Gıda maddelerinden ayrılan (izole edilen) ve taninan (identifiye edilen) kufler uzerinde arastirmalar. *Gida* **9**, 253-264.

Torres, M.; Balcells, M.; Sala, N.; Sanchis, V. and Canela, R. (1998). Bactericidal and fungicidal activity of *Aspergillus ochraceus* metabolites and some derivatives. *Pesticide Science* **53**, 9-14.

Tudzynski, B.; Kawaide, H. and Kamiya, Y. (1998). Gibberellin biosynthesis in *Gibberalla fujikuroi*: Cloning and characterization of the copalyl diphosphate synthase gene. *Curr Genet* **34**, 234-240.

Turner, W.B. (1971). Fungal Metabolites. Academic Press, London.

Turner, W.B. and Aldridge, D.C. (1983). Fungal metabolites II; Academic Press, Inc.: London, New York.

U

Ueno, Y. (1984). In Batina, V. (Editor), Mycotoxins – Production, isolation, separation and purification, Elsevier, Amsterdam, ch. 15, p. 239.

Ueno, Y.; Kubota, K.; Ito, T. and Nakamura, Y. (1978). Mutagenicity of carcinogenic mycotoxins in *Salmonella typhimurium*. *Cancer Res* **38**, 536-42.

Umeda, M.; Tsutsui, T. and Saito, M. (1977). Mutagenicity and inducibility of DNA single –strand breaks and chromosome aberrations by various mycotoxins. *Gann* **68**, 619-25.

Untrau, S.; Lebrihi, A.; Lefebvre, G. and Germain, P. (1994). Nitrogen catabolite regulation of spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. *Curr Microbiol* **28**, 111-118.

V

Vagelos, P.R. (1964). Lipid metabolism. *Ann Rev Biochem* **33**, 139.

Valenta, H. and Richter, W. (1998). Untersuchungen zur Reversibilität eines Ochratoxin A-Dekontaminationsverfahrens. In: 20. Mykotoxin-Workshop, 8-10 June 1998, Detmold: Bundesanstalt für Getreide-, Kartoffel- und Fettforschung, 10.

Vancura, A.; Rezanka, T.; Maršálek, J.; Melzoch, K.; Basarova, G. and Kristan, V. (1988). Metabolism of L-threonine and fatty acids and tylosin biosynthesis in *Streptomyces fradiae*. *FEMS Microbiol Lett* **49**, 411-415.

Van der Merwe, K.J.; Steyn, P.S. and Fourie, L. (1965). Mycotoxins. Part 2. The constitution of ochratoxins A, B, and C, metabolites of *Aspergillus ochraceus* Willh. *J Chem Soc* **87**, 7083-7088.

Varga, J.; Kevei, É.; Tóth, B.; Kozakiewicz, Z. and Hoekstra, R. F. (2000). Molecular analysis of variability within the toxigenic *Aspergillus ochraceus* species. *Can J Microbiol* **46**, 593-599.

Venkatasubbaiah, P.; Sutton, T.B. and Chilton, W.S. (1991). Effect of phytotoxins produced by *Botryosphaeria obtusa*, the cause of black rot of apple fruit and frog-eye leaf spot. *Physiol Biochem* **81**, 243-247.

Vinci, V. and Byng, G. (1998). Strain improvement by non-recombinant methods. In: Demain, A.L., Davies, J.E. (eds) Manual of industrial microbiology. *Am Soc Microbiol* Washington, DC, pp. 103-113.

Vining, L. C. (1990). Function of secondary metabolites. *Annu Rev Microbiol* **44**, 395-427.

Voelker, F. and Altaba, S. (2001). Nitrogen source governs the patterns of growth and pristinamycin production in *Streptomyces pristinaespiralis*. *Microbiology* **147**, 2447-2459.

Waites, M. J.; Morgan, N. L.; Rockey, J.S. and Higon, G. (2001). Industrial Microbiology-An Introduction, Blackwell Science, London.

Wallace, K. K.; Payne, G. F. and Speedie, M. K. (1990). Ammonium effects on streptonigrin biosynthesis by *Streptomyces flocculus*. *J Ind Microbiol* **6**, 43-48.

Wang, G. Y.; Borgeson, B. M. and Grews, P. (1997). Pitholides A-D, Polyketides from a marine Tunicate- derived culture of *Pithomyces* sp. *Tetrahedron Letters* **38**, 8449-8452.

Watanabe, T.; Izaki, K. and Takahashi, H. (1982). New polyenic antibiotics active against gram positive and negative bacteria. II. Screening of antibiotic producers and taxonomical properties of *Gluconobacter* sp. W-315. *J Antibiot* **35**, 1148-1155.

Weete, J.D. (1980). Lipid biochemistry of fungi and other organisms. Plenum Press. New York, chap. 4.

Weinberg, E.D. (1978). Secondary metabolism: regulation by phosphate and trace elements. *Folia Microbiol* **23**, 496-501.

Weisleder, D. and Lillehoj, E.B. (1971). Structure of viriditoxin, a toxic metabolite of *Aspergillus viridimutans*. *Tetrahedron Lett* **12**, 4705-4706.

Whalley, A.J.S. (1994). Science in Parliament **51**, 19.

White, A.; Handler, P.; Smith, E.L.; Hill, R.L. and Lehman, I.R. (1978). Principles of biochemistry. McGraw-Hill, New York, chaps. 12, 14 and 17.

Wilhelm, K.A. (1887). Beitrage zur Kenntnis der Pilzgattung *Aspergillus*. Inaug. Diss. Strassburg, 66.

Williams, W. K. and Katz, E. (1977). Development of a chemically defined medium for the synthesis of actinomycin D by *Streptomyces parvulus*. *Antimicrob Agents Chemother* **11**, 281-290.

Wilson, B. J.; Campbell, T. C.; Hayes, A. W. and Hanilin, R. T. (1968). Investigation of reported aflatoxin production by fungi outside the *Aspergillus flavus* group. *Appl Microbiol* **16**, 819-821.

Wilson, D.M.; Mubatanhema, W. and Jurjevic, Z. (2002). Biology and ecology of mycotoxigenic *Aspergillus* species as related to economic and health concerns. *Adv Exp Med Biol* **504**, 3-17.

Wilson, D. M.; Tabor, W. H. and Trucksess, W. (1976). Screening method for the detection of aflatoxin, ochratoxin, zearalenone, penicillic acid and citrinin. *J Assoc Off Anal Chem* **59**, 125-127.

Wilson, B.J. and Wilson, C.H. (1962). Extraction and preliminary characterization of a hepatotoxic substance from cultures of *Penicillium rubrum*. *J Bacteriol* **84**, 283-290.

World Health Organization (WHO) (2002). Report of the 56th Meeting of the joint FAO/WHO Expert Committee on Food Additives Geneva, Switzerland, 6-15.

X

Xiao, H.; Madhyastha, S.; Marquardt, R.R.; Li, S.; Vodela, J.K.; Frohlich, A.A. and Kempainen, B.W. (1996). Toxicity of ochratoxin A, its opened lactone form and several of its analogs: structure-activity relationships. *Toxicol Appl Pharmacol* **137**, 182-192.

Xiao, H.; Marquardt, R. R. ; Abramson, D. and Frohlich, A. A. (1996). Metabolites of ochratoxins in rat urine and in a culture of *Aspergillus ochraceus*. *Appl Environ Microbiol* **62**, 648-655.

Y

Yabuta, T. and Sumiki, Y. (1933). Metabolite from *Aspergillus ochraceus*. *J Agric Chem Soc Japan* **9**, 1264.

Yang, W.; Kim, W. S.; Fang, A. and Demain, A.L. (2003). Carbon and Nitrogen source nutrition of Fumagillin biosynthesis by *Aspergillus fumigatus*. *Curr Microbiol* **46**, 275-279.

Yoon, Y. J. and Choi, C. Y. (1997). Nutrient effects on FK-506, a new immunosuppressant, production by *Streptomyces* sp. in a defined medium. *J Ferm Bioeng* **83**, 599-603.

Z

Zahner, H. and Kurth, R. Overproduction of microbial products (Eds.: V. Krumphanzl, B. Sikyta, Z. Vanek), Academic Press, London, **1982**, pp. 167-179.

ANNEXE
PUBLICATIONS
SUR LE SUJET

1 Characterization and regulation of new secondary metabolites from
2 *Aspergillus ochraceus* M18 obtained by UV mutagenesis

3 Gamal Awad¹, Florence Mathieu¹, Yannick Coppel² and Ahmed Lebrihi^{1*}

4 Laboratoire de Génie Chimique, Equipe "Génie des Systèmes Microbiens" UMR 5503 (CNRS,
5 INPT, UPS), ENSAT, 1 Avenue de l'Agrobiopôle, B.P. 107, F-31 326, Auzeville Tolosane Cedex,
6 Toulouse, France

7 * Author for correspondence: Tel.: +33 (0) 5 62 19 39 44 / Fax: +33 (0) 5 62 19 39 01

8 E-mail: lebrihi@ensat.fr

9 **ABSTRACT**

10 UV Irradiation of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174 conidia, led to obtain stable mutations in
11 ochratoxin and penicillic acid pathways. Among these mutants especially M18 produced an
12 unexpected large number of new metabolites. Two new compounds were purified by TLC and
13 HPLC chromatography and their chemical structures were determined. They are 2, 10-dimethyl 4-
14 hydroxy-6-oxo-4-undecen-7-yne (1) and 4-(3-methyl-2- butenyl) oxy 1-phenyl acetic acid (2).
15 Compound 1 is very active against Gram positive bacteria such as *Staphylococcus aureus* and
16 *Bacillus subtilis* but inactive against Gram negative bacteria, fungi and yeasts. However, compound
17 2 has no antibiotic activity. The production of 1 was generally associated to the growth while that of
18 the compound 2 was dissociated from the growth. The biosynthesis of these two metabolites was
19 influenced by the sources of carbon and nitrogen.

20 **Keywords:** *Aspergillus ochraceus*, ochratoxin, penicillic acid, secondary metabolites, mycotoxins,
21 regulation

22 INTRODUCTION

23 Ochratoxin A (OTA) and penicillic acid cause significant problems to animal and human health
24 (Hao *et al.*, 1996). These two molecules could be synthesized by *Aspergillus* and *Penicillium*.
25 Among the producing species of these two mycotoxins, *Aspergillus ochraceus* is one of the most
26 important. It is able to produce other metabolites derived from these two mycotoxins such as
27 diaporthin, orthosporin and asperlactone (Hadidane *et al.*, 1992; Stander *et al.*, 2000; Harris and
28 Mantle, 2001).

29 *A. ochraceus* could produce other secondary metabolites, having a biological activity, not
30 characterized until now. These molecules may be beneficial (antibiotics) or harmful (mycotoxins)
31 for human health (Schwartz *et al.*, 1988; Marquardt and Frohlich, 1992; Jayant and Suresh, 1999).
32 Some of these metabolites may be intermediates in the biosynthesis of OTA or of penicillic acid
33 (Jonathan and Peter, 2001). The accumulation of such secondary metabolites may be induced by
34 changing the conditions of culture (Bode *et al.*, 2002) or by mutagenesis (Aziz and Smyk, 2002).

35 Generally, the biosynthesis of secondary metabolites in bacteria or in fungi is controlled by carbon,
36 nitrogen sources and phosphate ions. The nature and concentration of carbon and nitrogen sources
37 regulate secondary metabolism production through phenomena catabolic repression (Martin and
38 Demain, 1980; İçgen *et al.*, 2002; Lopez *et al.*, 2003).

39 During our study, several mutants, non-producers of OTA and penicillic acid, were isolated after
40 exposure to UV, and two accumulated metabolites were characterized and the effects of different
41 carbon and nitrogen sources were evaluated.

42 **METHODS**

43 **Micro-organisms.** Strains used in this study were: *Aspergillus ochraceus* Wilhelm NRRL 3174,
44 *Micrococcus luteus* ATCC 9314, *Bacillus subtilis* ATCC 6633, *Staphylococcus aureus* CIP 7625,
45 *Mycobacterium smegmatis* ATCC 607 (mc2 155), *Listeria monocytogenes* (Institut Pasteur
46 d'Alger), *Klebsiella pneumoniae* CIP 82.91, *Pseudomonas syringae* pathovar *syringae* No 1882,
47 *Agrobacterium tumefaciens* No 2410, *Mucor ramannianus* NRRL 1829 and *Saccharomyces*
48 *cerevisiae* ATCC 4226.

49 **Medium and culture condition.** *A. ochraceus* Wilhelm NRRL 3174 was grown on a synthetic agar
50 medium (SAM) of the following composition (per liter of distilled water): 3 g NH_4NO_3 , 26 g
51 K_2HPO_4 , 1 g KCl, 1 g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 10 ml mineral solution (of the following composition , per
52 liter of distilled water: 70 mg $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 10\text{H}_2\text{O}$, 50 mg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1000 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$,
53 30 mg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 11 mg $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 1760 mg $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, and the pH was adjusted to 2
54 with 2 N HCl), 15 g agar and 50 g glucose. The pH of the medium was adjusted to 6.5 by 2 N HCl
55 and autoclaved at 120 °C for 20 min.

56 Production of metabolites by the mutant M18 *A. ochraceus* and kinetics studies were carried out in
57 the same medium without agar. The effect of carbon sources (glucose, fructose, galactose, glycerol,
58 sucrose, maltose, starch and dextrin), 50 g.l⁻¹, on growth and metabolite productions was tested in
59 the presence of NH_4NO_3 (3 g.l⁻¹) as sole nitrogen source. While, when the following six nitrogen
60 sources (37.5 mM): NH_4NO_3 , NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, L-glutamic acid, L-methionine and L-
61 phenylalanine were used as sole sources of nitrogen, the glucose (50 g l⁻¹) was used as sole source
62 of carbon. The medium was prepared, adjusted to pH 6.5 with 2 N HCl, and autoclaved at 120 °C
63 for 20 min without the sugar components, these were autoclaved and added aseptically before
64 inoculation.

65 **Production and characterization of the mutants.** The suspension of spores of *A. ochraceus*
66 NRRL 3174 (10⁶ spores.ml⁻¹) was exposed to UV light ($\lambda = 254$ nm) under shaking. Parts of the
67 suspension (20 µl) of the UV exposed spores were taken every 30 seconds in sterile Eppendorf
68 tubes for 4 min. TSTW (0.95 g l⁻¹ Trypton salt broth and 3.3 µl Tween 80 were mixed and
69 completed to 100 ml with distilled water, then sterilized), 980 µl, were added. The suspension of the
70 UV exposed spores was spread into Petri dish containing 20 ml synthetic agar medium (SAM) and
71 incubated at 25° C. After 5 days, the colonies were examined under UV light ($\lambda = 365$ nm) for
72 determining the isolates which did not exhibit fluorescence (non-producers of ochratoxin A), then,

73 the mutants were cultivated and isolated three times in Petri dish containing SAM until total
74 purification and stored at -20°C in 25 % glycerol.

75 Mutants were characterized by their cultivation into 250 ml Erlenmeyer flasks containing liquid
76 synthetic medium (100 ml) and incubated for 13 days at 25°C without shaking. After the
77 fermentation, the cultures were filtered and the filtrate was extracted with an equal volume of
78 chloroform. The chloroform extract was evaporated to dryness and the residue was dissolved in 1
79 ml of methanol and taken as the crude extract then injected to HPLC for chromatographic
80 comparison to parental strain.

81 **Purification and characterization of new metabolites.** Crude extract was applied to TLC on silica
82 gel, GF 254 (Merck). The plates were run in the same direction with toluene/ ethyl acetate/ 90 %
83 formic acid (5: 4: 1, v/v/v). The fluorescent spots were examined under UV light ($\lambda = 365\text{ nm}$), then
84 the observed bands were scraped off separately and the silica gel was sonicated with methanol.
85 After filtration and evaporation, the residue was re-dissolved in methanol and injected to
86 preparative HPLC for further purification.

87 **High-performance liquid-chromatography (HPLC) analysis.** The HPLC apparatus consisted of
88 a solvent delivery system and a fluorescence ($\lambda_{\text{ex}} = 332\text{ nm}$; $\lambda_{\text{em}} = 466\text{ nm}$) and UV detectors. The
89 analytical column used was a 150 x 4.6 mm Uptisphere 5 μm C18 ODB fitted with a guard column
90 of 10 x 4 mm. The mobile phase consisted of a mixture of HPLC grade acetonitrile/water/acetic
91 acid (100/99.8/0.2) and the column temperature was 30°C . Kroma 3000 (BIO-TEK) was the data
92 acquisition system. Injections were done with an auto-injector (BIO-TEK, Milan, Italy) and the
93 injection volume was 80 μl . The elution was at a flow rate of 1 ml min^{-1} for 45 min. Elution phase
94 used is acetonitrile (B) and acetic acid in water 0.2 % (A). The sample was eluted with a linear
95 gradient from 10 % to 50 % of B over the first 30 min followed by a linear gradient to 90 % of B
96 from 30 to 35 min and then a steady flow of 90 % of B through 8 min and then reduced to 10 % of
97 B through 2 min.

98 **UV, IR, Mass and Nuclear Magnetic Resonance analysis.** Ultraviolet spectra (UV) were
99 recorded on a Beckman DU-65 spectrophotometer, using methanol as solvent. Infrared (IR) spectra
100 with a Bruker IFS48, the mass spectra were recorded on Finnigan LCQ spectrometer equipped with
101 a nano-electrospray ion source 'nano-ESI'. The scan-range was from 100 to 1000 m/z . $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR
102 spectroscopy were used for the characterization of the compounds. All the ^1H and ^{13}C signals were
103 unambiguously assigned in the basis of chemical shifts (δ), spin-spin coupling constants (J) and
104 signal intensities and by ^1H - ^1H cosy, ^1H - ^{13}C HMQC and ^1H - ^{13}C HMBC experiments. The NMR

105 spectra were recorded with a Bruker AMX 400 spectrometer with the solvent signals as reference
106 ($^1\text{H}/^{13}\text{C}$: DMSO 2.50/40.36).

107 **Test for activity against bacteria, fungi and yeasts.** Biological activity was tested against
108 bacteria, fungi and yeasts. The suspension of micro-organisms (24 μl) was added into 200 ml
109 bottles containing 100 ml of ISP2 (International *Streptomyces* Project 2) medium of the following
110 composition (per litre of distilled water): 4 g yeast extract, 10 g malt extract, 4 g glucose, and 12 g
111 agar. The pH of the medium was adjusted to 7.2 with 4 N NaOH. The two metabolites 1 and 2 were
112 dissolved in methanol–water (3: 7, v/v) and sterilized under UV light ($\lambda = 254 \text{ nm}$) for 15–20 min.
113 ISP2 (20 ml) containing the tested micro-organisms were added into Petri dish, and left to cool,
114 then, compounds 1 and 2 were added to two wells with 9 mm of diameter into Petri dish, pre-
115 incubated at 4 °C for 2 h to allow uniform diffusion into the agar. After pre-incubation, the Petri
116 dish was incubated for 24 h at 30 °C.

117 **Biomass determination.** Dry cell weight (DCW) was determined by filtering 100 ml of the broth
118 through a 0.45 μm Millipore cellulose filter, washed twice and then dried at 105 °C in oven for 24
119 h.

120 The cultivations were performed in duplicate and DCW, 1 and 2 quantifications were performed at
121 least two times. Standard deviations never exceed 7 % for DCW and 10 % for 1 and 2.

122 **RESULTS**

123 **Isolation of non-producing ochratoxin A mutants (*OTA*⁻)**

124 Among the isolated mutants *OTA*⁻ (Table 1), some mutants (M2 and M12) lost the ability to produce
125 all studied secondary metabolites. They also lost their pigmentation. Except for these two mutants,
126 the others kept their ability to produce the mellein. However, some of the mutants aren't able to
127 produce the hydroxymellein (M4 and M9). The mutants M1 and M13 did not produce
128 hydroxymellein however they did not lose totally their ability to produce OTA. The level of
129 production of OTA was very weak compared to the wild strain.

130 *A. ochraceus* produced isoasperlactone (ISO), asperlactone (AS) and penicillic acid (PA). Among
131 the obtained mutants, certain did not produce any one but others produced one or two of these three
132 compounds. For example, the mutants M5, M10 and M17 were *PA*⁻, *ISO*⁺, *AS*⁺, the mutant M7 was
133 *PA*⁺, *ISO*⁻, *AS*⁺, the mutants M9, M13, M15, and M16 were *PA*⁻, *ISO*⁻, *AS*⁺ and the mutant M4 was
134 *PA*⁻, *ISO*⁻, *AS*⁻.

135 Among all the obtained mutants, certain accumulate new metabolites. As in the case of the mutant
136 M16, it accumulated two new metabolites having retention times (RT); 16.5 and 18 min. These two
137 metabolites seem to be trienes as shown by their spectra UV/vis (λ_{max} = 254, 262 and 273 nm). M3,
138 M4, M5, M11, M14 and M16 also produced a new product having a retention time of 21 min. The
139 mutant M18 was the most important by their ability to excrete new products (8 new metabolites).
140 This mutant was used for the purification and the characterization of two new metabolites.

141 **Separation and purification of the new metabolites**

142 In this study, we were interested in two new metabolites (RT = 24 and 31 min) produced by the
143 mutant M18 *A. ochraceus*. The mycelium and culture filtrate (7 Liters) were extracted with
144 chloroform and evaporated to dryness under vacuum at 45 min °C to give a yellow residue (6 g).
145 The fractionation of the crude extract of the mutant M18 *A. ochraceus* on silica gel TLC showed 7
146 main fluorescent bands (data not shown) which have relative mobility (*R_f*) of 0.33, 0.44, 0.5, 0.55,
147 0.58, 0.63 and 0.84. Analysis of the *R_f*, 0.58 band (3.2 g) by HPLC showed that the band contained
148 the two considered compounds. The use of preparative HPLC led to total purification of the two
149 compounds 1 and 2. The real isolated yields per liter of fermentation broth were 7.4 mg for 1 and
150 5.2 mg for 2.

151 **Spectroscopic data and structure characterization of two new metabolites**

152 On the basis of the spectroscopic data (Table 2 and Fig.2) the structures of the two new compounds
153 1 and 2 were established as 2, 10-dimethyl 4-hydroxy-6-oxo-4-undecen-7-yne (1) and 4-(3-methyl-
154 2- butenyl) oxy 1-phenyl acetic acid (2) (Fig. 1).

155 **Biological activities**

156 Biological activity of compound 1 (Table 3) was assayed against five Gram positive bacteria (*M.*
157 *luteus*, *B. subtilis*, *S. aureus*, *M. smegmatis* and *L. monocytogenes*), three Gram negative bacteria
158 (*K. pneumoniae*, *P. syringae pathovar. syringae* and *A. tumefaciens*), one filamentous fungus (*M.*
159 *ramannianus*) and one yeast (*S. cerevisiae*). This compound had an inhibitory effect on *B. subtilis*
160 and *S. aureus* but it had no effects on the other tested strains. However, compound 2 did not show
161 any effects on the all tested strains. Further studies must be conducted to show if compound 1 has
162 an interesting MIC against *S. aureus* as compared to other known antibiotics.

163 **Effect of different carbon sources on the growth and specific production of 1 and 2**

164 Table 4 summarizes the relationship between (DCW_{max}), specific growth rate (μ) and specific
165 production of 1 and 2 from cultures in the presence of eight different carbon sources.

166 Growth of the mutant M18 *A. ochraceus* was influenced by carbon sources. Except for galactose
167 and glycerol (0.01 h^{-1}), all carbon sources allowed high specific growth rate ($0.02\text{-}0.04\text{ h}^{-1}$).
168 Galactose, glycerol and dextrin supported the lowest DCW ($7\text{-}9\text{ g l}^{-1}$) comparatively to the other
169 carbon sources. The highest DCW was obtained in the presence of fructose (21.1 g l^{-1}).

170 Specific production of 1 and 2 was regulated by the studied carbon sources. The lowest value was in
171 the presence of glucose and fructose ($135\text{-}150\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) for 1 and in the presence of fructose,
172 galactose and glycerol ($0.30\text{-}0.54\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) for 2. The highest values were obtained when the
173 mutant was cultivated in the presence of galactose, dextrin and sucrose ($607\text{-}955\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) for
174 1 and only in the presence of dextrin ($6.2\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) for 2 (Table 4). Dextrin is better carbon
175 source than the starch for the production of these two metabolites.

176 Kinetic evolution of specific production showed that in the presence of dextrin or sucrose,
177 compound 1 was early produced (Fig. 3a). Maximum of specific production was obtained after five
178 days of incubation. After this period no production was observed. In the presence of other carbon
179 sources as galactose, the production was late (after seven days) and maximum production was
180 obtained after nine days.

181 The specific production of 2 showed a different kinetic rate than that of 1. In the case of dextrin and
182 sucrose, the production started during the stationary growth phase, while in the presence of the

galactose, the production started during the active growth phase and continued to increase lately (Fig.3b).

Effect of different nitrogen sources on the growth and specific production of 1 and 2

The study was conducted in the presence of six different nitrogen sources. Results are summarized in Table 5. Amino-acids as nitrogen sources supported the lowest specific growth rate ($0.01\text{--}0.02\text{ h}^{-1}$) than the mineral nitrogen sources (0.032 h^{-1}). The mutant M18 *A. ochraceus* developed more quickly in the presence of the glutamic acid (0.02 h^{-1}) by comparison to the methionine (0.014 h^{-1}) and the L-phenylalanine (0.01 h^{-1}). However, the methionine allowed better yield of biomass production; the DCW_{max} was 13.6 g l^{-1} , while it is only 6.2 and 4.3 g l^{-1} in the presence of L-glutamic acid and L-phenylalanine respectively. In the case of the three mineral nitrogen sources, the specific growth rate was the same (0.032 h^{-1}) but the DCW_{max} was better in the presence of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (30.15 g l^{-1}) than in the presence of NH_4Cl (8.94 g l^{-1}) and NH_4NO_3 (13.38 g l^{-1}).

Specific productions of 1 and 2 were controlled by nitrogen sources. The most important production was supported in the presence of L-phenylalanine, L-glutamic acid and L-methionine (874.7 , 769.4 and $710.3\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$ respectively) in the case of 1 and in the presence of L-glutamic acid ($4.14\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) followed by NH_4NO_3 ($2.68\text{ mg g}^{-1}\text{ DCW}$) in the case of 2. The other nitrogen sources supported the lowest specific production.

The kinetic productions of 1 and 2 were the same as observed in the presence of carbon sources. The specific production of 1 was associated to the growth (Fig. 4a). The maximum specific production was obtained after 5 to 7 days of incubation. However, the specific production of 2 is dissociated from the growth (Fig. 4b). It started only after 7 to 9 days of incubation and the maximum specific production was obtained after 13 to 15 days of incubation.

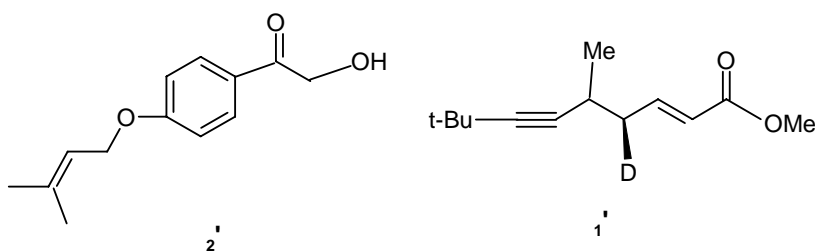
DISCUSSION

The mutation of fungal spores is nowadays an interesting research point. Variants of *Aspergillus* sp. and *Penicillium* sp. can be obtained after treatment with UV irradiation. Mutagenesis or combinatorial biosynthesis offers an easy possibility to generate new enzymatic activities resulting in modified products (Kennedy and Hutchinson, 1999).

In the case of *A. ochraceus* NRRL 3174, the use of the UV irradiation during a short time exposition allowed the obtaining of several interesting variants. Those lost the ability to produce OTA, asperlactone, isoasperlactone and/or penicillic acid, can serve to characterize the accumulated intermediates and to help so in the understanding of the biosynthetic pathway of these mycotoxins. These variants can also serve for producing new molecules of industrial interest. It is for example

the case of the mutant M6 which is *OTA*⁻ but the yield of mellein and the hydroxymellein is increased by four folds. These two compounds are phytotoxins and can be used as bio-herbicides (Parisi *et al.*, 1993). The mutant M6 will serve, in following studies, to develop the processes of production of these two bio-herbicidal.

Compound 1 has the same molecular weight (*m/z* 208) and the same molecular formula (C₁₃H₂₀O₂) of compound **1'** (2-Nonen-6-ynoic-4-d acid, 5,8,8-trimethyl-, methyl ester) but its structure is partially different (Mitsudo *et al.*, 1985) where, compound **1'** was synthesized chemically by reacting 1, 3-butadiene and its derivatives with aliphatic terminal acetylenes.



Compound 2 has the same molecular weight (*m/z* 220) and the same molecular formula C₁₃H₁₆O₃ of compound **2'** (Ethanone, 2-hydroxy-1-[4-[(3-methyl-2-butenyl) oxy] phenyl]) and both structures coincide completely except metabolite 2 is an acid but compound **2'** is primary alcohol. Compound **2'** can be converted to a range of benzylic and allylic compounds and utilized to prepare the antifungal natural product citaldoxime (Kanno and Taylor, 2002).

Moreover, compound 2 is phenyl acetic acid derivative, which may be used as precursor for producing the ω -cycloheptyl fatty acids. These coincide with Moore *et al.* (1997) which reported that the origin of the cycloheptyl carboxylic acid starter unit of the ω -cycloheptyl fatty acids produced by *Alicyclobacillus cycloheptanicus* could be derived from a homo-shikimate pathway by showing phenyl acetic acid to be the precursor. Phenyl acetic evidently undergoes an oxidative ring expansion followed by a series of reductions to give the observed metabolite prior to incorporation into the fatty acids.

The carbon/energy and nitrogen sources were necessary for the growth and product formation in microbial cultivation.

In *A. ochraceus* M18, the kinetic of 1 and 2 productions was different. Compound 1 was produced during a growth active phase, while 2 was produced during stationary growth phase. The majorities of secondary metabolites have the same kinetic of 2 but some secondary metabolites were produced early during the active growth phase. This is the case of clavulanic acid produced by *Streptomyces clavuligerus* (Lebrihi *et al.*, 1987).

242 Studies on the effect of carbon sources indicated that the productions of 1 and 2 were regulated by
243 carbon catabolism, as in the case with many other secondary metabolite biosynthesis, such as
244 cephamycin (Aharonowitz and Demain, 1978; Lebrihi *et al.*, 1988), penicillin and cephalosporin
245 (Martin *et al.*, 1999), Kojic acid (Rosfarizan and Ariff, 2000) and lovastatin (Lai *et al.*, 2003). On
246 the other hand, it is not clear that the carbon sources allowing a weak specific growth rate, gave
247 systematically and mutually strong specific production where, every source of carbon is a particular
248 case. To refine these results, it is advisable to study the effect of the concentrations of these carbon
249 sources on the specific growth rate and on the specific productions of 1 and 2.

250 Fraleigh *et al.* (1989) reported that catabolite regulation is a general regulatory mechanism in which
251 a key enzyme involved in a metabolic pathway is repressed, inhibited, or inactivated when a
252 commonly used substrate is added. Many cases of a negative glucose effect on secondary
253 metabolism have been reported (Gallo and Katz, 1972; Hurley and Bialek, 1974; Telma *et al.*,
254 2003). It was found that glucose negatively affected the biosynthesis of penicillin by repressing
255 biosynthetic pathway enzymes (Martin *et al.*, 1999). In general, biosynthesis of different secondary
256 metabolites (antibiotics, etc.) was inhibited by rapidly fermentable carbon sources.

257 Among the mineral nitrogen sources, ammonium was known to be exercised a catabolite regulation
258 on the secondary metabolism (Litzka *et al.*, 1999, Demain 1991, Omura *et al.*, 1980a; Giordano *et*
259 *al.*, 1999). Amino acids can be shared among those that stimulate, inhibit or rest to be neutrals
260 toward the production of the secondary metabolites, depending on their capacity to release
261 ammonium ions in culture medium or to be allowed precursors' accumulation during their
262 assimilation by microorganisms (Untrau *et al.*, 1994).

263 In the case of 1, we noticed clearly that amino acids allowed a better production than the mineral
264 nitrogen sources. The later would exercise a catabolite regulation by ammonium ions. These were in
265 agreement with Fraleigh *et al.* (1989) which reported that the organic nitrogen sources were
266 favorable for kojic acid production as compared to inorganic nitrogen sources. The three tested
267 amino acids could supply interesting precursors for the biosynthesis of 1. This may be possible
268 because the production of this compound is probably associated to the assimilation and degradation
269 phase of the mentioned amino acids. In the case of 2, the phenomena are more complex. Among the
270 studied amino acids, only the glutamic acid allowed a good specific production. The two other
271 aromatic amino acids are bad nitrogen sources for the biosynthesis of 2. Ammonium ions permit a
272 weak production but when nitrate was associated with ammonium the production was enhanced.

273 Catabolite repression by the ammonium ions can regulate the secondary metabolites by inhibiting
 274 and/or by repressing enzymes allowing the biosynthesis of the precursors. This was observed in the
 275 case of the production of the α -aminoadipic acid, precursor for cephalosporin production in
 276 *Streptomyces clavuligerus* and *Cephalosporium acremonium*. In these microorganisms, the enzyme
 277 catalysing this reaction (ϵ -aminotransferase) was repressed by ammonium ions. The same
 278 phenomenon was observed in biosynthesis of the spiramycin in *Streptomyces ambofaciens*. In this
 279 microorganism the valine deshydrogenase, the first enzyme of degradation of the valine, was
 280 strongly repressed by ammonium ions decreasing the availability of an important precursor
 281 (isobutyrate) (Lebrihi *et al.*, 1992, Lounes *et al.*, 1995, Tang *et al.*, 1994, Lee *et al.*, 1997).
 282 Catabolite repression can also affect the level of the enzyme activities required in the secondary
 283 metabolism pathways. It is the case of the repression of the ACV synthetase and isopenicillin
 284 synthetase by the ammonium ions in *C. acremonium* and *S. clavuligerus*.

285 REFERENCES

- 286 Aharonowitz, Y. and Demain, A. L. 1978. Carbon catabolite regulation of cephalosporin production
 287 in *Streptomyces clavuligerus*. Antimicrob. Agents Chemother. 14: 159-164.
- 288 Aziz, N.H. and Smyk, B. 2002. Influence of UV radiation and nitrosamines on the induction of
 289 mycotoxins synthesis by nontoxigenic moulds isolated from feed samples. Nahrung/Food 46: 118-
 290 121.
- 291 Bode, H. B., Bethe, B., Höfs, R. and Zeeck, A. 2002. Big effects from small changes: possible ways
 292 to explore nature's chemical diversity. Chem. Biochem. 3: 619-627.
- 293 Demain, A.L. 1991. Production of beta-lactam antibiotics and its regulation. Proc. Natl. Sci. Counc.
 294 Repub. China B 15: 251-65.
- 295 Fraleigh, S., Bungay, H. and Fiechter, A. 1989. Minireview-regulation of oxidoreductive yeast
 296 metabolism by extracellular factors. J. Biotechnol. 12: 185-198.
- 297 Gallo, M. and Katz, E. 1972. Regulation of secondary metabolite biosynthesis: Catabolite
 298 repression of phenoxazinone synthase and actinomycin formation by glucose. J. Bacteriol. 109:
 299 659-667.
- 300 Giordano, W., Avalos, J., Cerdas, E. and Domenech, C.E. 1999. Nitrogen availability and
 301 production of bikaverin and gibberellins in *Gibberella fujikuroi*. FEMS Microbiol. Lett. 173: 389-
 302 393.

303 Hadidane, R., Bacha, H., Creppy, E.E., Hammami, M., Ellouze, F. and Dirheimer G. 1992. Isolation
 304 and structure determination of natural analogues of the mycotoxin ochratoxin A produced by
 305 *Aspergillus ochraceus*. Toxicology 76: 233-43.

306 Hao, X., Ronald, R., David, A. and Avdrew, A.1996. Metabolites of ochratoxins in rat urine and in
 307 a culture of *Aspergillus ochraceus*. Appl. Environ. Microbiol. 62: 648-655.

308 Harris, J. P. and Mantle, P. G. 2001. Biosynthesis of diaportin and orthosporin by *Aspergillus*
 309 *ochraceus*. Phytochemistry 57: 165-169.

310 Hurley, L. H. and Bialek, D. 1974. Regulation of antibiotic production: Catabolite inhibition and
 311 the dualistic effect of glucose on indolmycin production. J. Antibiot. 27: 49-56.

312 İçgen, Y., İçgen, B. and Özcengiz 2002. Regulation of crystal protein biosynthesis by *Bacillus*
 313 *thuringiensis* : II. Effects of carbon and nitrogen sources. Res. Microbiol. 153: 603-609.

314 Jayant, N. and Suresh, R. 1999. Moderate protective effect of 6-MFA, a microbial metabolite
 315 obtained from *Aspergillus ochraceus* on immunological liver injury in mice. Comp. Immunol.
 316 Microbiol. Infect. dis. 22: 15-25.

317 Jonathan, P. H. and Peter, G. M. 2001. Biosynthesis of ochratoxins by *Aspergillus ochraceus*.
 318 Phytochemistry 58: 709-716.

319 Jonathan, P. H. and Peter, G. M. 2001. Biosynthesis of diaporthin and orthosporin by *Aspergillus*
 320 *ochraceus*. Phytochemistry 57: 165-169.

321 Kanno, H. and Taylor, R. 2002. Tandem oxidation processes: the direct conversion of activated
 322 alcohols to oximes; synthesis of citaldoxime. Synlett 8:1287-1290.

323 Kennedy J. and Hutchinson C.R. 1999. Nurturing nature: engineering new antibiotics.
 324 Nat. Biotechnol. 17:538-9.

325 Lai, L. T., Pan, C. C. and Tzeng, B. K. 2003. The influence of medium design on lovastatin
 326 production and pellet formation with a high - producing mutant of *Aspergillus terreus* in submerged
 327 cultures. Process Biochem. 38: 1317-1326.

328 Lebrihi A, Lamsaif D, Lefebvre G, Germain P. 1992. Effect of ammonium ions on spiramycin
 329 biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 37: 382-7.

330 Lebrihi A., Germain P. and Lefebvre G. 1987. Phosphate repression of cephamycin and clavulanic acid
 331 production by *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol., 26: 130-135.

332 Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. 1988. Carbon catabolite regulation of cephamycin C and
 333 expandase biosynthesis in *Streptomyces clavuligerus*. Appl. Microbiol. Biotechnol. 28: 44-51.

334 Lee, S.H. 1997. Ammonium ion affecting tylosin production by *Streptomyces fradiae* NRRL 2702
 335 in continuous culture. Lett. Appl. Microbiol. 25: 349-352.

336 Litzka O., Then Bergh K., Van den Brulle J., Steidl S., Brakhage A.A. 1999. Transcriptional control
 337 of expression of fungal beta-lactam biosynthesis genes. Antonie Van Leeuwenhoek. 75: 95-105.

338 Lopez, C. J. L., Perez, S. J. A., Sevilla, F. J. M., Fernandez, A. F. G., Grima, M. E. and Chisti, Y.
 339 2003. Production of lovastatin by *Aspergillus terreus* : Effects of the C : N ratio and the principal
 340 nutrients on growth and metabolite production. Enzyme Microb. Tech. 23: 270-277.

341 Lounes A., Lebrihi A. Benslimane C., Lefebvre G. and Germain P. 1995. Regulation of valine
 342 catabolisme by ammonium in *Streptomyces ambofaciens*, producer of spiramycin. Can. J.
 343 Microbiol. 41: 800-808.

344 Marquardt, R.R. and Frohlich, A.A. 1992. A review of recent advances in understanding
 345 ochratoxicosis. J Anim Sci. 70:3968-88.

346 Martin, J.F. and Demain, A. L. 1980. Control of antibiotic biosynthesis. Microbiol. Rev. 44: 230-
 347 251.

348 Martin, J.F., Casqueiro, J., Kosalkova, K., Marcos, A.T. and Gutiérrez, A. 1999. Penicillin and
 349 cephalosporin biosynthesis: Mechanism of carbon catabolite regulation of penicillin production.
 350 Antonie van Leeuwenhock 75: 21-31.

351 Mitsudo, T., Nakagawa, Y., Watanabe, K., Hori, Y., Misawa, H. Watanabe, H. and Watanabe, Y.
 352 1985. The first selectve linear codimerization of terminal acetylenes and 1,3-dienes catalyzed by
 353 dihydridotetrakis (trialkylphosphine) ruthenium complexes. J. Org. Chem. 50:565-571.

354 Moore, B. S., Walker, K., Tornus, I., Handa, S., Poralla, K. and Floss, H.G. (1997). Biosynthetic
 355 Studies of ω -Cycloheptyl Fatty Acids in *Alicyclobacillus cycloheptanicus*. Formation of
 356 Cycloheptanecarboxylic Acid from Phenylacetic Acid. J. Org. Chem. 62:2173-2185.

357 Omura, S. , Tanaka, Y. , Tanaka, H. , Takahashi, Y. and Iwai, Y. 1980a. Stimulation of the
 358 production of macrolide antibiotics by magnesium phosphate and related insoluble materials. J.
 359 Antibiot. 33: 1568-1569.

360 Parisi, A., Piattelli, M., Tringali, C. and Magnano, G. 1993. Identification of the phytotoxin mellein
 361 in culture fluids of *Phoma tracheiphila*. Phytochemistry 32: 865-867.

362 Rosfarizan, M. and Ariff, A.B. 2000. Kinetics of kojic acid fermentation by *Aspergillus flavus* using
 363 different types and concentrations of carbon and nitrogen sources. J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 25:
 364 20-24.

365 Schwartz, R., Liesch, J., Hensens, O., Zitano, L., Honeycutt, S., Garrity, G., Fromtling, R., Onishi,
 366 J. and Monaghan, R. 1988. L-657-398, a novel antifungal agent: fermentation, isolation, structural
 367 elucidation and biological properties. J. Antibiot. 41: 1774-1779.

368 Stander, M.A., Bornscheuer, U.T., Henke, E. and Steyn, P.S. 2000. Screening of commercial
 369 hydrolases for the degradation of ochratoxin A. J. Agric. Food Chem. 48: 5736-9.

370 Tang, L., Zhang, Y.X. and Hutchinson, C.R. 1994. Amino acid catabolism and antibiotic synthesis:
 371 valine is source for precursors for macrolide biosynthesis in *Streptomyces ambofaciens* and
 372 *Streptomyces fradiae*. J. Bacteriol. 176:6107-6119.

373 Telma, E.B., Willibaldo, S., Alfredo, E.M., Janice, C. and Jorge, A.V.C. 2003. Influence of carbon,
 374 nitrogen and phosphorous sources on glucoamylase production by *Aspergillus awamori* in solid
 375 state fermentation. Z. Naturforsch. 58c: 708-712.

376 Untrau, S., Lebrihi, A., Lefebvre, G. and Germain, P. 1994. Nitrogen catabolite regulation of
 377 spiramycin production in *Streptomyces ambofaciens*. Curr. Microbiol. 28: 111-118.

378 **Figure legends:**

379 **Fig. 1.** Chemical structures of the new compounds 1 and 2.

380 **Fig. 2.** HMBC experiment of compounds 1 and 2.

381 **Fig. 3.** Kinetics of growth of the mutant M18 *A. ochraceus* (empty) and compounds 1 (a) and 2 (b)
382 specific productions (bold) in the presence of galactose (●,○), dextrin (■,□) and sucrose (▲,△).

383 **Fig. 4.** Kinetics of growth of the mutant M18 *A. ochraceus* (empty) and compounds 1 (a) and 2 (b)
384 specific productions (bold) in the presence of L-glutamic acid (●,○), NH₄Cl (▲,△), NH₄NO₃ (■,□)
385 and L-phenylalanine (▼,▽).

386 **Table 1.** The comparison between the HPLC chromatograms of the wild strain *A. ochraceus* NRRL
387 3174 (AO) and different mutants.

388 **Table 2.** Physical and chemical properties of the two new metabolites produced by the mutant *A.*
389 *ochraceus* M18.

390 **Table 3.** Effect of compounds 1 and 2 on the different micro-organisms.

391 **Table 4.** Effect of carbon sources on growth and specific productions of 1 and 2.

392 **Table 5.** Effect of nitrogen sources on growth and specific productions of 1 and 2.

393

394

| RT (min) | Name | AO | M1 | M2 | M3 | M4 | M5 | M6 | M7 | M8 | M9 | M10 | M11 | M12 | M13 | M14 | M15 | M16 | M17 | M18 |
|-------------|---------|------|------|----|------|------|------|-------|------|------|------|------|------|-----|------|------|------|------|------|------|
| 3.6 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 4.4 | | - | *** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 5 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 6 | ISO | **** | * | | **** | | **** | **** | | **** | | **** | | | | **** | | | **** | *** |
| 8 | AS | **** | ** | | **** | | **** | **** | **** | **** | ** | **** | | | **** | **** | **** | **** | **** | *** |
| 11 | PA | **** | **** | | **** | | | * | **** | * | | | **** | | | **** | | | | *** |
| 13 | | ** | - | | ** | * | | ** | ** | ** | | ** | | | | ** | | | | |
| 13.5 | Me-like | ** | | | ** | ** | | ** | | ** | | ** | | | | ** | | | ** | *** |
| 15 | | ** | ** | | ** | ** | ** | ** | | ** | | ** | ** | | | ** | ** | **** | **** | **** |
| 15.5 | HM | **** | | | **** | | **** | **** | **** | **** | **** | **** | * | | | **** | **** | **** | **** | *** |
| 16 | | *** | | | *** | | *** | *** | *** | *** | | **** | | | | *** | | **** | **** | * |
| 16.5 | TRI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** | - | * |
| 18 | TRI | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** | - | - |
| 20.5 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 21 | | - | - | - | ** | **** | *** | - | - | - | - | - | ** | - | - | ** | - | ** | - | - |
| 21.5 | | *** | *** | | *** | *** | *** | *** | *** | *** | | *** | *** | | | *** | *** | *** | *** | ** |
| 24 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 25,2 | | - | - | - | - | *** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 26.5 | Me | **** | **** | | **** | **** | **** | ***** | **** | **** | **** | **** | **** | * | **** | **** | **** | **** | **** | *** |
| 28 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** |
| 29 | | - | *** | - | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | *** |
| 31 | | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - | **** |
| 32 | | - | ** | - | - | ** | - | ** | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - |
| 34 | OTA | **** | ** | | | | | | | | | | | | ** | | | | * | |
| 37 | | - | - | - | - | *** | - | - | - | - | ** | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

395 AO = *Aspergillus ochraceus*, M_n = Mutants, RT = Retention Time, OTA = Ochratoxin A, ISO = Isoasperlactone, AS = Asperlactone, PA = Penicillic acid, Me =
 396 Mellein, Me-lik = Mellein like, HM = Hydroxymellein and TRI = Triene. / Metabolite production: **** Strong, *** Medium, ** Weak, * Poor, - Nul /

397  New metabolites ,  Absence in the mutants
 398

| Properties | 1 | 2 |
|---|--|---|
| Appearance | Brown powder | Brown powder |
| Molecular formula | C ₁₃ H ₂₀ O ₂ | C ₁₃ H ₁₆ O ₃ |
| Molecular weight | 208 | 220 |
| MS (FAB, positive ions), <i>m/z</i> : | 207 (M-H) ⁺ , 164 (207– C ₃ H ₇), 121 (207– 2 x C ₃ H ₇) and 93 (207– 2 x C ₃ H ₇ – CO). | 219 (M-H) ⁺ , 175 (219 – CO ₂) and 106 (219 – CO ₂ – C ₅ H ₉). |
| UV [λ_{\max} , nm (ϵ)] in methanol | 230 (5531), 325 (4455) | 196 (13987), 228 (9926) |
| IR (KBr) | 3500 (OH), 3066 (C-H alkene), 2956 and 2870 (C-H aliphatic), 2200 (alkyne), 1644 (C=O), 1467, 1260, 1096, 1017 and 797 cm ⁻¹ . | 2500 - 3600 (Broad OH of COOH), 2963 and 2924 (CH aliphatic), 3050 (CH aromatic, alkene), 1712 (C=O), 1250 (C-O, in the aryl allyl ethers), 800 (1,4 disubstitution) and 1000 – 1300 cm ⁻¹ (C-O). |
| ¹ H NMR, 400 MHz in DMSO (δ , mult. J) | 0.85 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-1) ; 1.92 (1H, t-septuplet, J = 6.6, 7.3 Hz, H-2); 2.26 (2H, d, J = 7.3 Hz, H-3); 7.05 (1H, s, H-5); 11.98 (1H, br s, OH); 0.87 (6H, d, J = 6.6 Hz, H-11); 2.10 (1H, t-septuplet, J = 6.6, 7.1 Hz, H-10) and 2.47 (2H, d, J = 7.1 Hz, H-9). | 7.12 (2H, m, AA'XX' system, JAX/A'X'= 8.7 Hz, JAA'/XX' = 2.5 Hz, H-2 and H-6); 6.81 (2H, m, AA'XX' system, JAX/A'X'= 8.7 Hz, JAA'/XX' = 2.5 Hz, H-3 and H-5); 3.33 (2H, s, H-7); 11.5 (1H, br s, OH); 4.48 (2H, d-septuplet, J= 6.6, 0.7 Hz, H-9); 5.42 (1H, t-septuplet, J= 6.6, 1.3 Hz, H-10); 1.74 (3H, d, J= 1.3, 0.7 Hz, H-12) and 1.70 (3H, d, J= 1.3, 0.7 Hz, H-13). |
| ¹³ C NMR, 100 MHz in DMSO (δ) | 22.8 (C-1); 28.4 (C-2); 39.0 (C-3); 139.1 (C-4); 122.05 (C-5); 157.4 (C-6); 85 (C-7); 90 (C-8); 41.7 (C-9); 26.9 (C-10) and 23.4 (C-11). | 128.7 (C-1); 131.0 (C-2 and 6); 114.4 (C-3 and 5); 157.6 (C-4); 42.7 (C-7); 174.2 (C-8); 65.0 (C-9); 121.1 (C-10); 137.6 (C-11); 18.9 (C-12) and 26.3 (C-13). |

399

400

| Comp. | Conc. mg/ml | <i>M.</i> <i>luteus</i> | <i>B.</i> <i>subtilis</i> | <i>S.</i> <i>aureus</i> | <i>M.</i> <i>smegmatis</i> | <i>L.</i> <i>monocytogenes</i> | <i>K.</i> <i>pneumoniae</i> | <i>P.</i> <i>syringae</i> | <i>A.</i> <i>tumefasciens</i> | <i>M.</i> <i>ramannianus</i> | <i>S.</i> <i>cerevisiae</i> |
|----------|----------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------------|--------------------------------|------------------------------|----------------------------------|---------------------------------|--------------------------------|
| 1 | 1 | - | 17 | 9 | - | - | - | - | - | - | - |
| 2 | 1 | - | - | - | - | - | - | - | - | - | - |

401 - : No inhibition zone (mm).

402

403

404

405

406

407

408

409

410

411

| Carbon source | DCW _{max} (g l ⁻¹) | μ _{max} (h ⁻¹) | Specific production (mg.g ⁻¹ DCW) | |
|------------------|--|--|---|------|
| | | | 1 | 2 |
| Glucose | 14.17 | 0.023 | 135.4 | 2.00 |
| Fructose | 21.14 | 0.021 | 149.6 | 0.54 |
| Galactose | 7.25 | 0.010 | 955.2 | 0.29 |
| Glycerol | 9.01 | 0.012 | 318.0 | 0.51 |
| Sucrose | 16.25 | 0.025 | 607.2 | 2.29 |
| Maltose | 17.79 | 0.045 | 232.4 | 1.49 |
| Starch | 11.34 | 0.023 | 285.9 | 2.42 |
| Dextrin | 6.93 | 0.019 | 714.9 | 6.16 |

412

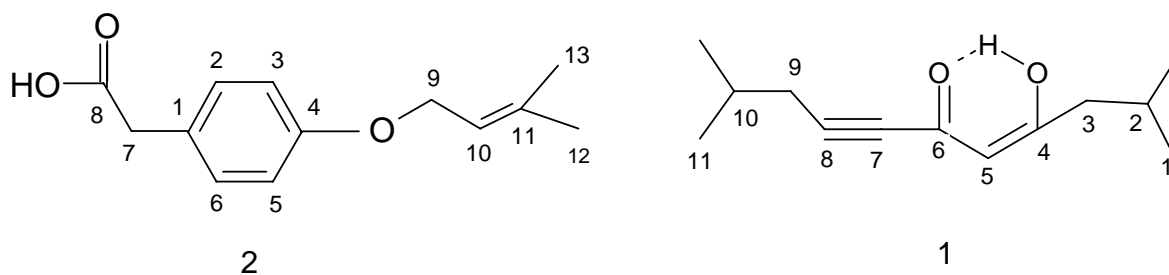
413
414

| Nitrogen source | DCW _{max} (g l ⁻¹) | μ _{max} (h ⁻¹) | Specific production (mg.g ⁻¹ DCW) | |
|---|--|--|---|------|
| | | | 1 | 2 |
| L- glutamic acid | 6.20 | 0.020 | 769.4 | 4.14 |
| NH ₄ Cl | 8.94 | 0.032 | 281.3 | 0.43 |
| NH ₄ NO ₃ | 13.38 | 0.033 | 234.1 | 2.68 |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 30.15 | 0.031 | 128.5 | 0.05 |
| L-methionine | 13.61 | 0.014 | 710.3 | 1.00 |
| L-phenylalanine | 4.34 | 0.009 | 874.7 | 0.79 |

415
416
417
418
419
420
421
422
423
424
425
426
427
428
429

430

431



432

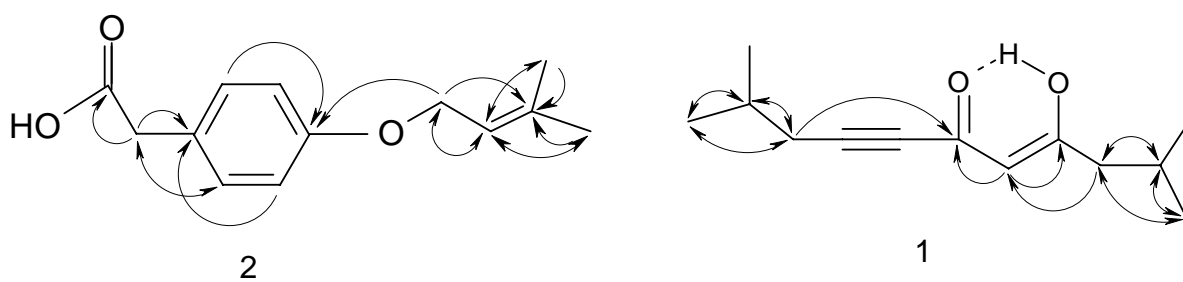
433 **Figure 1**

434

435

436

437

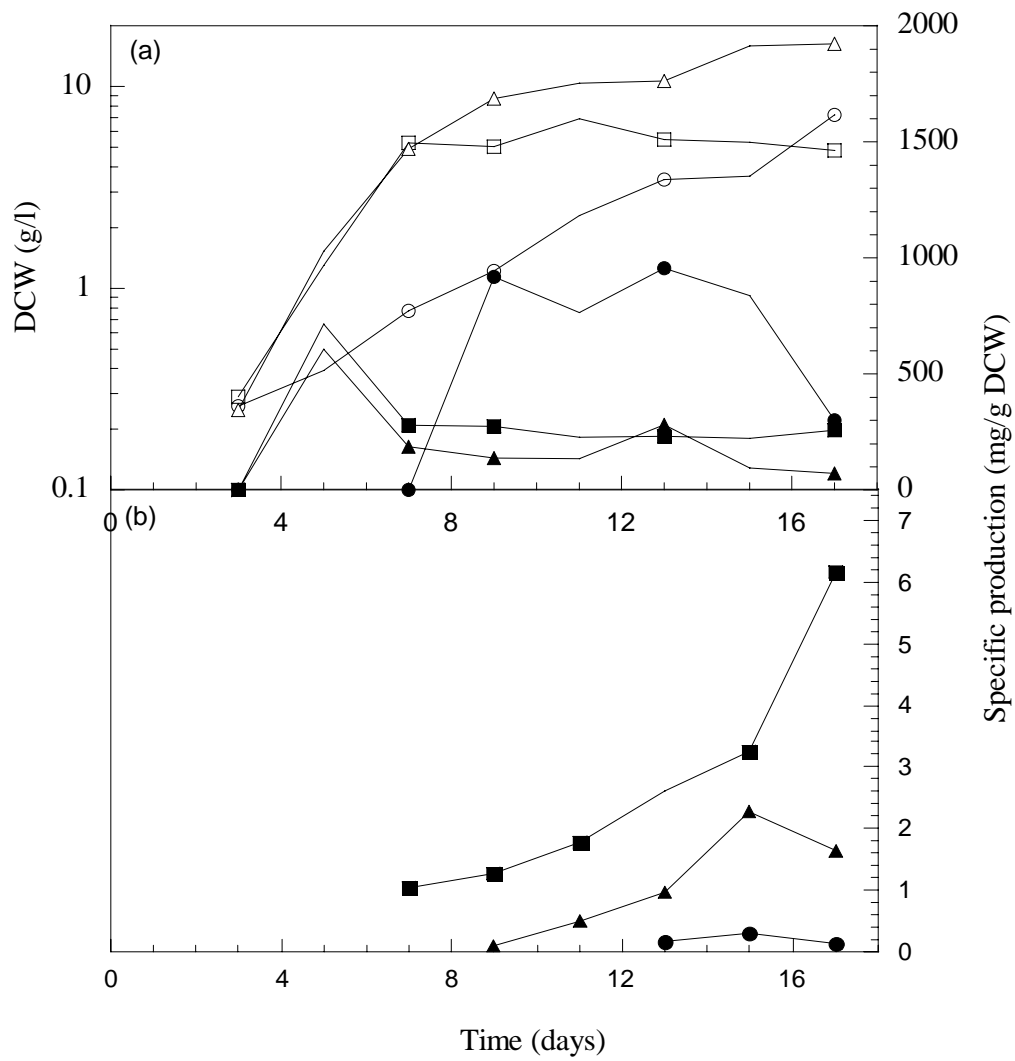


438

439

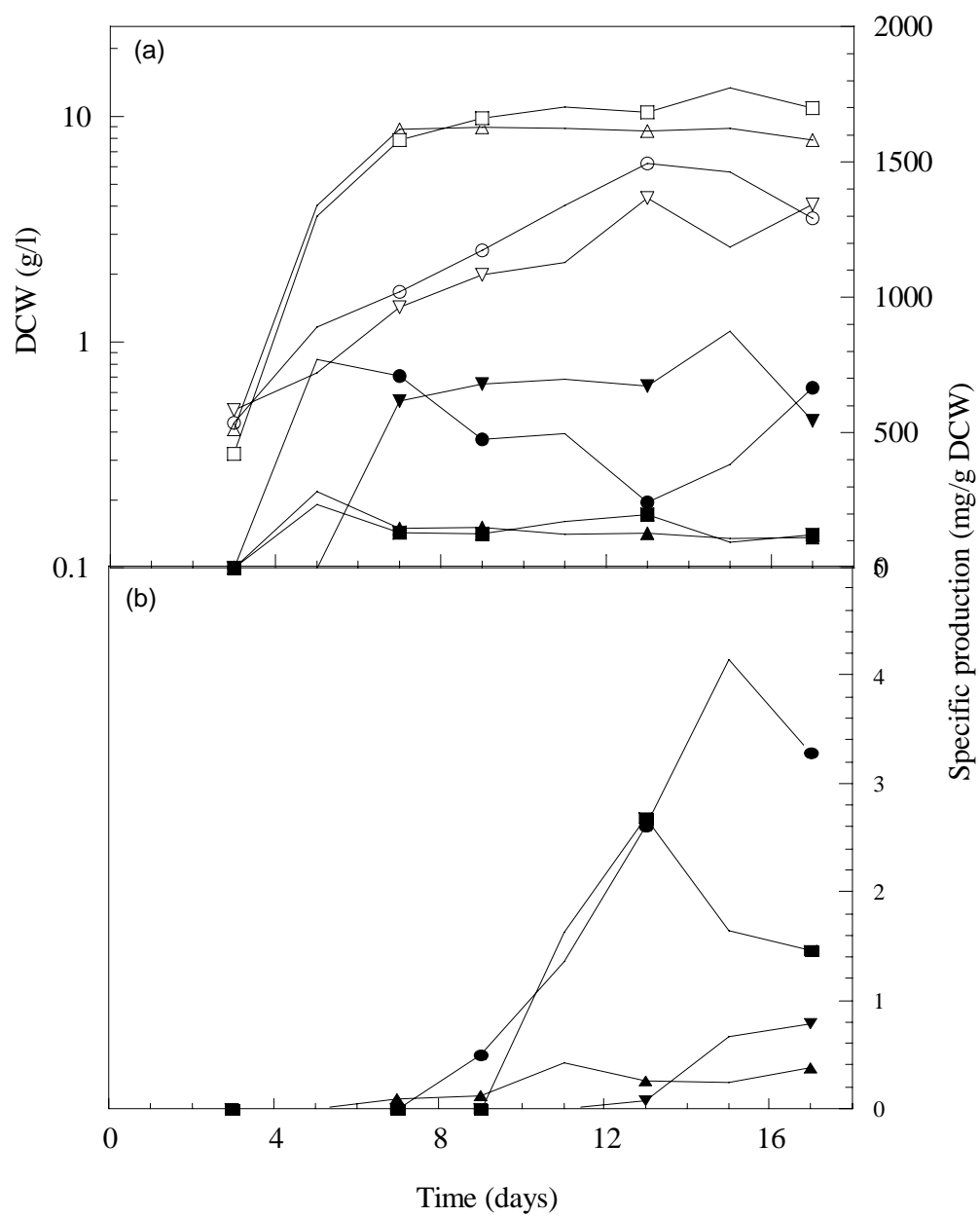
440 **Figure 2**

441
442



443
444 **Figure 3**

445
446
447



**Caractérisation et étude de l'effet des sources de carbone
et d'azote sur la production de nouveaux métabolites
secondaires chez *Aspergillus ochraceus* non producteur de
l'ochratoxine A**

**Characterization and study of the effect of the sources of
carbon and nitrogen on the productions of new secondary
metabolites by *Aspergillus ochraceus* non producer of
ochratoxin A**

Abstract

This work was aimed to investigate the characterization of new secondary metabolites and also the improvement of the production of other known metabolites by mutants of *Aspergillus ochraceus* NRRL 3174.

Under normal condition, the wild-strain *A. ochraceus* NRRL 3174 produced a limited number of secondary metabolites. The induced production of new metabolites has been achieved by exposure of the wild strain to UV. In these conditions, 18 mutants (non producers of ochratoxin A) have been obtained. The study was focused on the most important mutants; *A. ochraceus* M18, mutant capable to produce about 8 new metabolites and *A. ochraceus* M6, mutant capable to produce important quantities of mellein and 4-hydroxymellein (two herbicides).

Ten metabolites were separated and purified by TLC and HPLC in the mutant *A. ochraceus* M18 and their chemical structures were determined by spectroscopic methods (UV, IR, MS, and $^1\text{H}/^{13}\text{C}$ NMR). The data revealed four of these metabolites were new (2, 10-dimethyl 4-hydroxy-6-oxo-4-undecen-7-yne, 1, 4-(3-methyl-2-butenyl) oxy 1-phenyl acide acétique, 2, 4-Hydroxy-5,6-diisobutyl-5,6-époxy-pyrone, 3 and 3,13-Dihydro-6-hydroxy-3,13-diethanol-8,11-diisobutyl-7,12-pyrano-isocoumarin, 4) and the others were previously known (penicillic acid, dihydropenicillic acid, asperlactone, isoasperlactone, mellein and 4-Hydroxymellein).

Three of the four new secondary metabolites (1, 3 and 4) showed a significant biological activity against gram + bacteria (*Bacillus subtilis* and *Staphylococcus aureus*).

The productions of these ten metabolites have been studied in the presence of different sources of carbon and nitrogen. The productions of these metabolites are variables according to the nature of the source of nitrogen or carbon. However, we noticed that in the most cases, glutamic acid and phenylalanine as well as dextrans were the best sources of nitrogen and carbon for the production of these secondary metabolites.

The productions of mellein and 4-hydroxymellein are more important in the mutant *A. ochraceus* M6 than that in the wild strain *A. ochraceus* NRRL 3174. Indeed, the yield of these compounds can be multiplied until almost 5 times. The best source of carbon used for the productions of mellein (709.08 mg/g DCW) and 4-hydroxymellein (109.4 mg/g DCW) was dextrin with concentration of 100 g/l. Excess concentrations of dextrans don't affect negatively the production of mellein whereas, the presence of concentrations of glucose higher than 50 g/L affect negatively this production. In the presence of glucose, the excreted quantity of citric acid is more important than in the case of dextrans. In the case of non excess concentrations, the production of mellein was stimulated in the presence of ammonium ions.

Key words: *Aspergillus ochraceus*, UV mutagenesis, purification, separation, spectroscopic analysis, regulation, carbon and nitrogen sources, new secondary metabolites, biological activity.

Résumé

Ce travail s'est donné pour objectifs la caractérisation de nouveaux métabolites secondaires ainsi que l'amélioration de la production d'autres composés déjà connus par des mutants d'*Aspergillus ochraceus* NRRL 3174. En effet, en condition normale, la souche sauvage *A. ochraceus* NRRL 3174 ne produit qu'un nombre limité de métabolites secondaires. L'induction de la production de nouveaux métabolites a été réalisée par exposition aux UV. Dans ces conditions, 18 mutants (non producteurs d'ochratoxine A) ont été obtenus. Deux mutants importants ont été retenus pour l'étude; *A. ochraceus* M18, mutant capable de produire environ 8 nouveaux métabolites et *A. ochraceus* M6, mutant capable de produire des quantités importantes de melleine et de 4-hydroxymelleine (deux herbicides).

Dix métabolites ont été séparés et purifiés par chromatographie sur couche mince (CCM) et par HPLC (High-Performance Liquid Chromatography) chez le mutant *A. ochraceus* M18 et leurs structures chimiques ont été déterminées par des méthodes spectroscopiques (UV, IR, MS, et ^1H / ^{13}C RMN). Les données ont révélé que quatre de ces métabolites étaient nouveaux. Il s'agit du 2, 10-diméthyl 4-hydroxy-6-oxo-4-undécen-7-yne (1), du 4-(3-méthyl-2-butenyl) oxy 1-phényl acide acétique (2), du 4-Hydroxy-5,6-diisobutyl-5,6-époxy-pyrone (3) et du 3,13-Dihydro-6-hydroxy-3,13-diéthanol-8,11-diisobutyl-7,12-pyrano-isocoumarine (4), la structure chimique des six autres étaient précédemment connus (l'acide pénicillique, l'acide dihydropénicillique, l'asperlactone, l'isoasperlactone, la melleine et le 4-hydroxymelleine). Trois des quatre nouveaux métabolites (1, 3 et 4) ont montré une forte activité biologique vis-à-vis des bactéries gram + (*Bacillus subtilis* et *Staphylococcus aureus*). La production de ces dix métabolites a été étudiée en présence de différentes sources de carbone et d'azote. La production de ces métabolites est variable selon la nature de la source d'azote ou de carbone. Cependant, nous constatons que dans la plupart des cas, l'acide glutamique et la phénylalanine ainsi que les dextrines étaient les meilleures sources d'azote et de carbone pour la production de ces métabolites secondaires.

La production de la melleine et de l'hydroxymelleine est plus importante chez le mutant *A. ochraceus* M6 que chez la souche sauvage. En effet, le rendement peut être multiplié jusqu'à 5 fois. La meilleure source du carbone utilisée pour la production de melleine (709,08 mg/g PS) et de 4-hydroxymelleine (109,4 mg/g PS), était la dextrine de 100 g/l. Des concentrations en excès de dextrines n'affectent pas négativement la production de la melleine alors que, des concentrations en glucose supérieures à 50 g/L affectent négativement cette production. En présence du glucose, la quantité d'acide citrique excrétée est beaucoup plus importante que dans le cas de la dextrine. À des concentrations non excédentaires, la production de la melleine est stimulée en présence d'ion ammonium.

Les mots clés: *Aspergillus ochraceus*, UV mutagenèses, purification, séparation, analyse spectroscopique, régulation, sources de carbone et d'azote, nouveaux métabolites secondaires, activité biologique.